

Rec'd PCT/PTO

08 MAR 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 18 日 (18.03.2004)

PCT

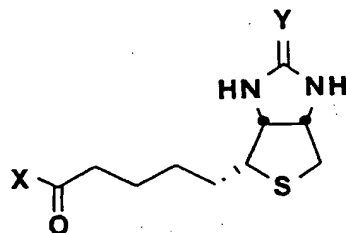
(10) 国際公開番号
WO 2004/022565 A1

- (51) 国際特許分類: C07D 495/04, (74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒530-0041 大阪府 大阪市 北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル 原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009973
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 6 日 (06.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-263414 2002 年 9 月 9 日 (09.09.2002) JP
特願2003-190637 2003 年 7 月 2 日 (02.07.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目1番8号 Saitama (JP). 鹿児島大学 長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒890-8580 鹿児島県 鹿児島市 郡元 1-2 1-2 4 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 隅田 泰生 (SUDA, Yasuo) [JP/JP]; 〒890-0005 鹿児島県 鹿児島市 下伊敷 1-1 3-1-1 0 6 Kagoshima (JP). 荒野 明男 (ARANO, Akio) [JP/JP]; 〒890-0081 鹿児島県 鹿児島市 唐湊 1-1 5-1-1 8 0 1 Kagoshima (JP). 林 秀樹 (HAYASHI, Hideki) [JP/JP]; 〒771-0130 徳島県 徳島市 川内町加賀須野 4 6 3-3 0, E-3 1 0 Tokushima (JP). 楠本 正一 (KUSUMOTO, Shoichi) [JP/JP]; 〒562-0044 大阪府 箕面市 半町 3-5, C-1 1 4 Osaka (JP). ソベール マイケル (SOBEL, Michael) [US/US]; 98112 ワシントン州 シアトル ピーチコートイースト 1624 WA (US).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:
— AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)の指定のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

[続葉有]

(54) Title: MULTIPURPOSE LINKER COMPOUNDS AND LIGANDS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法



.... (1)

molecules at a high reproducibility on the surface of a support for protein analysis. A ligand in which saccharide molecules have been introduced into the above-described multipurpose linker compound.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/022565 A1

WO 2004/022565 A1



添付公開書類:

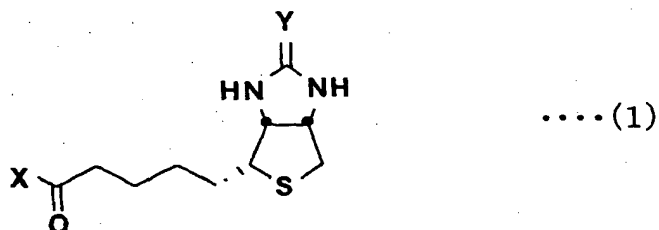
— 国際調査報告書

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する
申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

多岐用途型リンカー化合物は、下記一般式 (1)



(式中、YはO又はNHで表される構造を有する)にて表される構造を備えている。上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多分岐部位である構造を備えている。上記多岐用途型リンカー化合物は、タンパク質分析用の支持体表面上に、糖分子を再現性よく2次元的に配列することができる。また、リガンドは、上記多岐用途型リンカー化合物に糖分子が導入されてなる。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

1

明 細 書

多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法

技術分野

本発明は、チップテクノロジーやクロマトグラフィ、バイオプローブ等にて糖を使用する際に、糖の導入を好適にかつ効率よく行うために用いられる多岐用途型リンカー化合物、及び該多岐用途型リンカー化合物に糖を導入してなるリガンド、リガンド担持体、並びにこれらの製造方法に関するものである。

背景技術

生体内に存在する種々の糖は、特定のタンパク質と相互作用して、生物の活動や生命を維持するためのメカニズムの中で重要な役割を果たしている。そのため、糖とタンパク質との相互作用を調べることは、糖の生物活性を調べる上で重要となる。

糖と相互作用するタンパク質は、例えば、以下の手法によって検出される。すなわち、表面プラズモン共鳴（以下、SPRと記載する）法によれば、表面に糖が固定されているセンサチップを用いて、該糖とタンパク質との生化学的結合を調べることができる。また、アフィニティクロマトグラフィの担体に糖を固定すれば、糖と特異的に相互作用するタンパク質を分離精製することができる。さらに、遺伝子工学にて用いられるバイオプローブとして糖を用いれば、糖と相互作用するタンパク質を検出することができる。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

2

本発明者らは、これまでに、「日本化学会第79回春季年会－講演予稿集II、社団法人日本化学会、2001年3月15日、p. 1042」に開示されているように、上記SPRのセンサチップやアフィニティクロマトグラフィの担体等のタンパク質分析用の支持体に、種々のオリゴ糖を一段階にて導入して固定可能なリンカー化合物及び該リンカー化合物にオリゴ糖を導入してなるリガンドを見出している。

上記リンカー化合物は、芳香族アミン部位とビオチン部位とを有している。このうち、上記芳香族アミン部位は、オリゴ糖を導入するために用いられる。また、上記ビオチン部位は、ビオチン－ストレプトアビジン（又はアビジン）結合を利用して、タンパク質分析用の支持体表面に固定化するために用いられる。従って、このリンカー化合物を介することによって、オリゴ糖をタンパク質分析用の支持体に固定化することができる。

ところで、オリゴ糖は1分子だけでは活性がそれほど高くないため、オリゴ糖の生物活性を評価する場合には、通常、上記タンパク質分析用の支持体に3単位以上のオリゴ糖を集合化させて導入することが必要となる。そこで、上記リンカー化合物を介して、オリゴ糖を上記支持体に固定化する場合には、上記リンカー化合物に糖が導入されてなるリガンドを上記支持体表面上に集合化させることによって、3単位以上のオリゴ糖を集合化させなければならない。

なお、糖鎖の集合化及びそのリンカー合成法に関して、日本国特許公開公報2002-080488号（2002年3月19日公開）に開示されている。また、糖鎖の固定方法及びそのリンカー並びに糖鎖リガンド合成法に関しては、日本国特許公開公報2003-83969号（2

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

3

003年3月19日公開)に開示されている。また、チップに固定化した糖鎖とタンパク質との相互作用の表面プラズモン共鳴法を用いた解析に関しては、「H. Mach, D. B. Volkin, C. J. Burke, C. R. Middaugh, R. J. Linhardt, J. R. Fromm, D. Loganathan, *Biochemistry*, 32, 5480-5489 (1993)」に開示されている。また、糖鎖を集合化した分子の効果に関しては、「Eric K. Wollker and Marry J. Cloninger, *Org. Lett.*, 4, 7-10 (2000)」に開示されている。また、糖鎖の集合方法に関しては、「K. Matuura, H. Kitakouji, A. Tsuchida, N. Sawada, H. Ishida, M. Kiso and K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 7406-7407 (2000)」と「S. Koshida, Y. Suda, Y. Fukui, J. Ormsby, M. Sobel, S. Kusumoto, *Tetrahedron Lett.*, 40 5725-5728 (1999)」とに開示されている。また、多岐用途型リンカー分子の合成方法に関しては、「D. H. Tomalia, H. Barker and J. Roeck, *Polymer. Journal.*, 17, 117-132 (1985)」と「Christof Worner and Rolf Mulhaupt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 1306-1311 (1993)」とに開示されている。

しかしながら、上記従来のリンカー化合物を含んでなるリガンドを用いた場合、オリゴ糖の糖鎖をセンサチップ表面に2次的に集合化させて配列させることは可能であるが、その集合状態を制御して、再現性よく配列させることが困難であるという技術的課題が残されている。

すなわち、タンパク質分析用の支持体表面上に固定化されたオリゴ糖を用いて、該オリゴ糖の生物活性を精度よく観測するためには、オリゴ糖の糖鎖の集合状態を同一にし、オリゴ糖とタンパク質との間の相互作用を再現性よく観測することが求められる。ところが、上記従来のリガ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

4

ンドを用いた場合、3単位以上のオリゴ糖の糖鎖の集合状態は、リガンドの集合状態に依存することになり、3単位以上のオリゴ糖の糖鎖の集合状態を常に同一にすることができない可能性がある。オリゴ糖の糖鎖の集合状態が異なれば、観測されるオリゴ糖とタンパク質との相互作用も異なることになり、オリゴ糖の生物活性を再現性よく評価することが困難となる。

本発明は、上記の課題を解決するためになされたものであって、その目的は、タンパク質分析用の支持体上に糖を再現性よく2次元的に配列し得る新規な多岐用途型リンカー化合物、及び、該リンカー化合物に糖分子が導入されてなる新規なリガンド、リガンド担持体、並びにこれらの製造方法、さらに、これらを用いて糖分子と他の物質との相互作用を測定する方法を提供することにある。

発明の開示

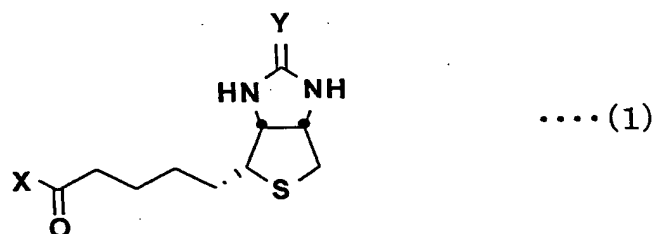
本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、4単位以上の糖分子を導入可能な部位として4つの芳香族アミノ基を有し、かつ、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質の検出や分離を行う際に用いられるタンパク質分析用の支持体に結合可能な部位としてビオチン部位又はイミノビオチン部位（以下、ビオチン部位と総称して記載する）を有する新規な多岐用途型リンカー化合物を用いることによって、上記支持体に4単位以上の糖分子を再現性よく2次元的に配列させることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明の多岐用途型リンカー化合物（以下、リンカー化合物と記載する）は、上記課題を解決するために、一般式（1）

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

5



(式中、YはO又はNHで表される構造を有する)にて表される構造を備え、上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素－窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多分岐部位である構造を備えていることを特徴としている。

上記炭化水素誘導鎖とは、炭素及び水素からなる炭化水素鎖にて、一部の炭素や水素が、他の原子や置換基に置き換わっていてもよいものを指すものとする。すなわち、上記炭化水素誘導鎖とは、末端に芳香族アミノ基を有し、炭化水素鎖の主鎖構造である炭素－炭素結合(C－C結合)の一部が、炭素－窒素結合(C－N結合)、炭素－酸素結合(C－O結合)やアミド結合(CO－NH結合)に置き換わっていてもよいものを指す。

上記の構成によれば、上記リンカー化合物は、上記タンパク質分析用の支持体に固定可能な部位として、ビオチン部位を有している。このビオチン部位は、ストレプトアビジン又はアビジン(以下、アビジンと総称して記載する)に高い親和性を示す。そのため、アビジンが固定されている支持体表面にて、ビオチン－アビジン結合が形成されるので、上記リンカー化合物を、上記支持体表面上に簡単に固定化することができる。

また、上記リンカー化合物は、種々の糖分子を簡便に導入できる部位

WO 2004/022565

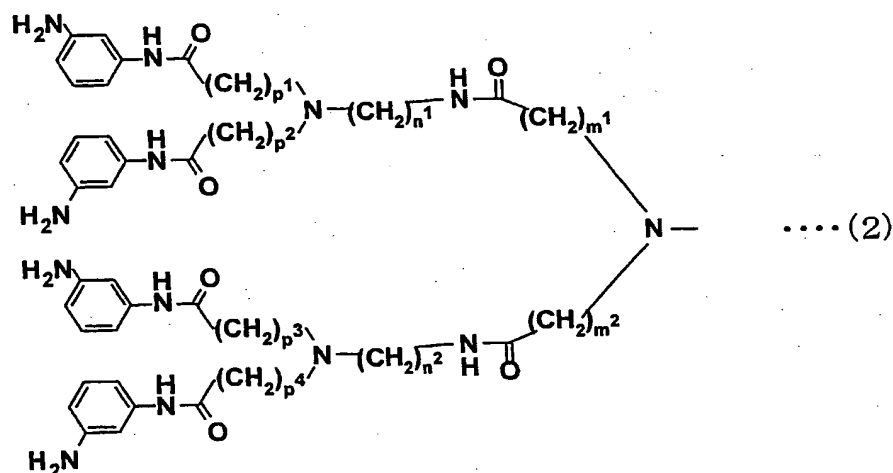
PCT/JP2003/009973

6

として、芳香族アミノ基を有している。上記芳香族アミノ基は、各炭化水素誘導鎖に含まれているので、上記リンカー化合物には、4単位以上の糖分子を導入することができる。また、導入された糖分子は、一つのリンカー化合物に導入されているので、導入された4単位以上の糖分子間を所定の間隔に保つことができる。これにより、上記リンカー化合物を介して、タンパク質分析用の支持体上に導入される糖分子の配列を再現性よく得ることができる。

さらに、上記リンカー化合物を用いれば、上記支持体表面に4単位以上の糖分子を集合化させることができるので、糖分子を再現性よく配列させることができ、それによって糖分子の十分な生物活性を得ることができる。これにより、糖分子とタンパク質との相互作用を検出することが可能になり、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

上記一般式(1)にて表されるリンカー化合物において、上記Xは、一般式(2)



7

(式中、 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , p^1 , p^2 , p^3 , p^4 は、それぞれ独立して、1以上6以下の整数)にて表される構造を備えていることが好ましい。

上記リンカー化合物のXは、上記炭化水素誘導鎖を4鎖有しているの
で、このリンカー化合物を介して、上記支持体上に4単位以上の糖分子
を導入することが可能である。そのため、上記リンカー化合物を用いる
ことによって、上記支持体表面にて導入された糖分子間の間隔を制御し
て、これらの糖分子を集合化させることができる。そのため、上記支持
体表面上にて、糖分子の配列を再現性よく得ることができる。

従って、上記リンカー化合物を用いることにより、再現性のよい糖分
子の生物活性を得ることが可能となる。これにより、糖分子の生物活性
を利用するSPRやアフィニティクロマトグラフィ、バイオプローブ等
にて、種々の糖分子とタンパク質との特異的な相互作用を好適に検出す
ることが可能になる。

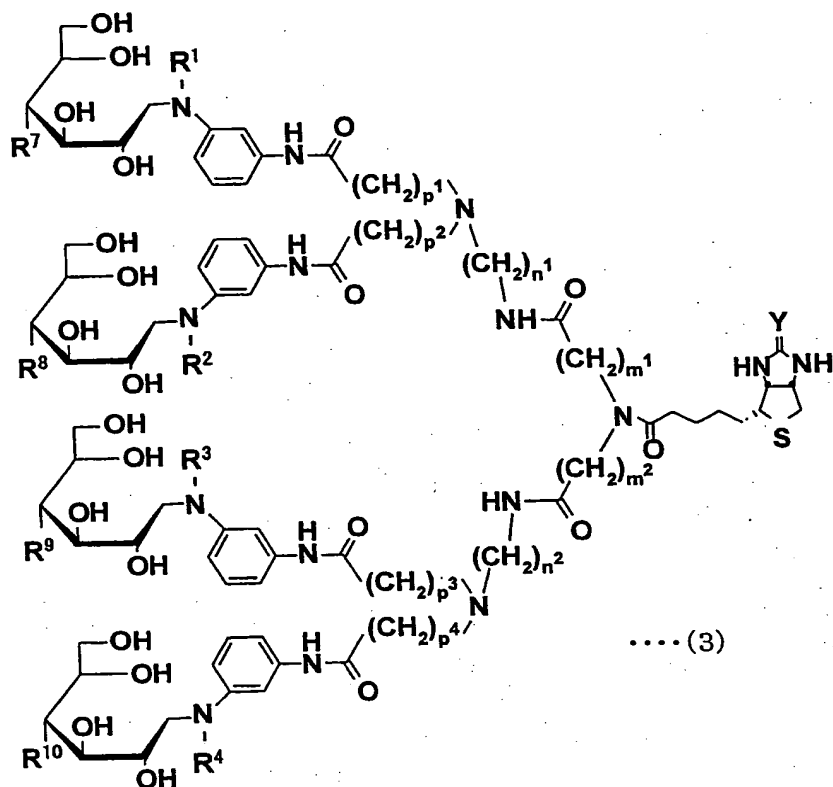
また、本発明のリガンドは、上記の課題を解決するために、上記した
いずれかのリンカー化合物の芳香族アミノ基に、糖分子を導入してなる
ものであることを特徴としている。

上記リガンドは、具体的には、一般式(3)

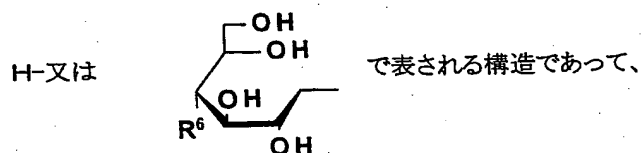
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

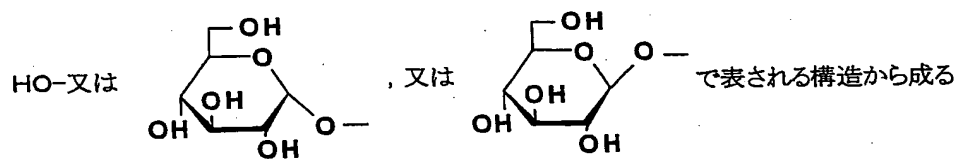
8



(式中、YはO又はNHで表される構造を有し、 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 は、それぞれ独立して、



R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} は、



群より選ばれる構造を有する)

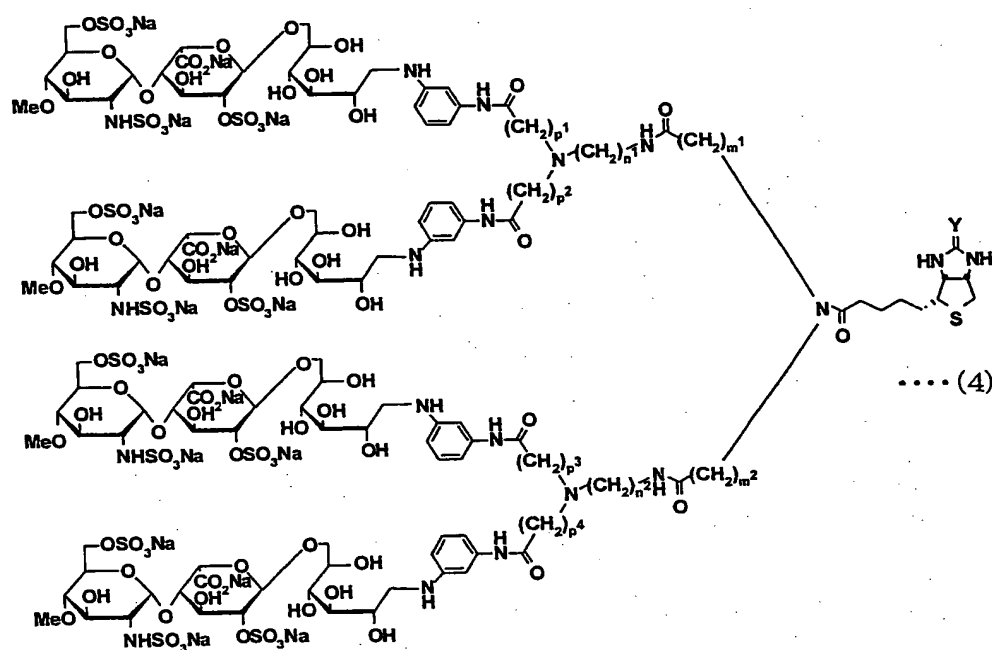
(式中、 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , p^1 , p^2 , p^3 , p^4 は、それぞれ独立して、1以上6以下の整数)にて表される構造を備えていることが好ましい

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

9

あるいは、上記リガンドは、一般式（４）



（式中、YはO又はNHで表される構造を有し、 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , p^1 , p^2 , p^3 , p^4 は、それぞれ独立して、1以上6以下の整数）にて表される構造を備えていることが好ましい。

上記リガンドのいずれかを用いることにより、上記タンパク質分析用の支持体表面に、4単位（一般式（４）にて表される構造を備えるリガンドの場合）又は4単位以上（一般式（３）にて表される構造を備えるリガンドの場合）の糖分子を固定化することができる。また、一つのリガンドは、4単位以上の糖分子を有しているので、上記支持体表面に2次元的に4単位以上の糖分子を集合化させることができるとともに、再現性よく配列させることができる。それゆえ、上記リガンドを用いることにより、SPRやアフィニティクロマトグラフィ、バイオプローブ等

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

10

にて、種々の糖分子とタンパク質との特異的な相互作用を効率よく検出することが可能になる。

また、本発明のリンカー化合物の製造方法は、上記の課題を解決するために、ビオチン系化合物と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を4鎖有するアミン化合物との縮合反応を行うステップと、上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護するステップとを含んでいることを特徴としている。

上記ビオチン系化合物とは、アミン化合物の二級アミノ基と反応し得るように、ビオチン構造又はイミノビオチン構造に置換基を導入して活性化されているものを指す。

上記の方法によれば、アビジンが固定されているタンパク質分析用の支持体に固定可能なビオチン部位と、糖分子を簡便に導入できる芳香族アミノ基とを有している、本発明のリンカー化合物を得ることができる。

また、本発明のリガンドの製造方法は、上記リンカー化合物のいずれかと、糖分子とを用いて、還元アミノ化反応を行うことを特徴としている。

上記の方法によれば、還元アミノ化反応により、リンカー化合物に簡便に糖分子を導入して、本発明のリガンドを得ることができる。

また、本発明の糖分子の導入方法は、上記のリガンドを含む溶液と、表面にストレプトアビジンまたはアビジンを固定化した支持体とを接触させることを特徴としている。

上記の方法によれば、上記リガンド（リガンドに含まれるリンカー化合物）のビオチン部位又はイミノビオチン部位と、上記支持体表面のス

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

11

トレプトアビジン又はアビジンとを結合させることによって、支持体表面に上記リガンドを固定することができる。従って、リガンドを含む溶液と支持体とを接触させるという簡便な方法で、リンカー化合物に結合した糖分子を支持体の表面に配列させることができる。

また、本発明のリガンド担持体は、リガンドを、ビオチン部位又はイミノビオチン部位と、ストレプトアビジン又はアビジンとの結合であるビオチン-アビジン結合を介して表面に固定化させてなることを特徴としている。

上記の構成によれば、ビオチン部位又はイミノビオチン部位と、ストレプトアビジン又はアビジンとの結合であるビオチン-アビジン結合を介して、支持体表面にリガンドを強固に固定することができるので、支持体表面に2次元的に複数の糖分子を再現性よく配列させてなるリガンド担持体を提供することができる。従って、上記リガンド担持体を用いれば、リガンドに含まれる糖分子と、該糖分子と相互作用するタンパク質等の物質との相互作用を再現性よく観測することができるので、糖分子の生物活性の定量的な評価が可能になる。

また、本発明の表面プラズモン共鳴の測定方法は、末端構造が異なる糖分子が導入されてなる少なくとも2つのセンサチップを用いて、上記少なくとも2つセンサチップは、第1の糖分子が支持体表面に固定化されてなる第1のセンサチップと、上記第1の糖分子とは末端構造が異なる第2の糖分子が支持体表面に固定化されてなる第2のセンサチップとを含み、第1のセンサチップを用いて得られた検出結果と、第2のセンサチップを用いて得られた検出結果との差を測定し、糖分子の相互作用を測定することを特徴としている。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

12

また、本発明の表面プラズモン共鳴の測定方法は、上記センサチップに、上記の同一の構造のリンカー化合物を用いて糖分子が固定化されることを特徴とする。

上記方法によると、糖分子以外は同じ構造のリガンドを有する少なくとも2つのセンサチップを用いて、表面プラズモン共鳴（SPR）測定をすることができるため、少なくとも2つのセンサチップ相互作用の差は、糖分子に起因したものとして観測される。従って、上記測定方法を用いれば、糖分子以外の部分と、他の物質との非特異的な相互作用を低減させ、糖分子と他の物質との特異的な相互作用を観測することができる。

本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、本発明におけるリガンドを導入するために、アビジンを固定した表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサチップを作成する工程を示す斜視図である。

図2は、本発明にかかるリガンド導入チップの斜視図であり、（a）はタンパク質との相互作用がない場合を表し、（b）はタンパク質との相互作用がある場合を表す。

図3は、本発明のリガンドのSPR測定に用いた「2チャンネル解析法」の模式図である。

図4は、本発明のリガンド担持体を得る工程におけるSPR測定の結

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

13

果を表すグラフである。

図5は、本発明のリガンド (M a l - B i o) と比較例のリガンド (A c e - M a l) との相互作用を表すS P R測定の結果を表すグラフである。

図6は、本発明のリガンド5, 3 - M a l および8 - G l cと、コンカナバリンAとの相互作用を表すS P R測定の結果を表すグラフである。

図7は、本発明におけるリガンド担持体を有するアフィニティカラムを作成する工程を示す図である。

図8は、アフィニティクロマトグラフィの手順を表す図である。

図9は、4 - M a l とタンパク質との結合についてのS D S - P A G Eの結果を表す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明するが、本発明はこれらによりなんら限定されるものではない。

本発明の多岐用途型リンカー化合物（以下、リンカー化合物）は、オリゴ糖等の糖（以下、糖分子と記載する）の生物活性を利用するS P Rやアフィニティクロマトグラフィ、遺伝子工学でのバイオプローブ等のように、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質の検出や分離を行う場合に、タンパク質分析用の支持体に糖分子の導入を好適に行うために用いられるものである。また、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用を有していないため、上記のようなタンパク質の検出や分離に好適に用いることができる。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

14

すなわち、本発明のリンカー化合物は、具体的には、前記一般式（1）にて示すように、上記タンパク質分析用の支持体に固定可能な部位として、ビオチン部位又はイミノビオチン部位（以下、ビオチン部位と総称）を有し、糖分子を導入可能な部位として、芳香族アミノ基を有している。

ビオチン又はイミノビオチン（以下、ビオチンと総称）は、塩基性の糖タンパク質であるストレプトアビジン又はアビジン（以下、これらを総称して、アビジンと記載する）と特異的に相互作用することが知られている。そのため、アビジンが固定されている支持体表面に、ビオチン部位を有する上記リンカー化合物を接触させると、ビオチン-アビジン結合が形成されて、上記リンカー化合物を上記支持体表面に簡単に固定化することができる。

また、上記リンカー化合物は、前記一般式（1）にてXで表される構造を備え、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多分岐部位を有している。この多分岐部位に含まれる芳香族アミノ基のアミノ基（ $-NH_2$ 基）は、糖分子中の平衡によって生じるアルデヒド基（ $-CHO$ 基）又はケトン基（ $-CR' O$ 基、 R' は炭化水素基）と反応する。そして、この反応によって形成されたシッフ塩基を引き続き還元することによって、芳香族アミノ基に糖分子が導入されることになる。上記Xは、4つの芳香族アミノ基末端を有しているので、上記リンカー化合物には、後述するように、4単位以上の糖分子を導入することができる。

上記Xは、具体的には、前記一般式（2）にて示すように、2鎖の炭化水素誘導鎖が、芳香族アミノ基とは反対側の末端にて、1つの窒素（

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

15

N) に結合した 2 分岐構造を 2 つ有している。そして、この 2 つの 2 分岐構造の上記窒素が、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_m-$ (ここで、 m は 1 ~ 6 の整数である) を介して、1 つの窒素 (N) に結合することによって多分岐構造を形成している。なお、上記一般式 (2) において、 m^1 , m^2 は、1 以上 6 以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、互いに同じ整数であってもよい。このうち、製造の簡便性の点から、 m^1 , m^2 は、互いに同じ整数であることが好ましく、特に 2 であることが好ましい。また、 n^1 , n^2 は、1 以上 6 以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、互いに同じ整数であってもよい。このうち、製造の簡便性の点から、 n^1 , n^2 は、互いに同じ整数であることが好ましく、特に 2 であることが好ましい。また、 $p^1 \sim p^4$ は、1 以上 6 以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、一部あるいは全てが同じ整数であってもよい。このうち、上記多分岐部位を有する化合物の製造時の簡便さの点から、上記 $p^1 \sim p^4$ は、互いに同じ整数であることが好ましく、特に 2 であることが好ましい。

このように、上記 X は、炭素や窒素等の原子にて、上記炭化水素誘導鎖を複数結合して分岐構造を形成している多分岐部位である構造を備えている。なお、上記 X に含まれる複数の炭化水素誘導鎖は、すべて同じであることが好ましいが、末端に芳香族アミノ基を有していれば、互いに異なる構造を備えていてもよい。

以上のように、一般式 (1) にて表される構造を備えているリンカー化合物は、ビオチン部位と芳香族アミノ基末端とを有している。これにより、上記リンカー化合物を介して、上記タンパク質分析用の支持体上

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

16

に、糖分子を強固にかつ簡単に結合させることができる。

また、上記リンカー化合物は、多分岐部位を有し、該多分岐部位の各末端に芳香族アミノ基を有している。そのため、上記リンカー化合物に糖分子を導入してなるリガンド（後述）を用いることにより、上記支持体表面に効率よく4単位以上の糖分子を集合化させることができる。また、一つのリンカー化合物には4単位以上の糖分子を導入することができるので、上記リガンドを支持体表面に結合させた場合に、複数の糖分子を再現性よく配列させることができる。

さらに、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用の影響をほぼ無視することができる。それゆえ、本発明のリンカー化合物を用いることによって、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

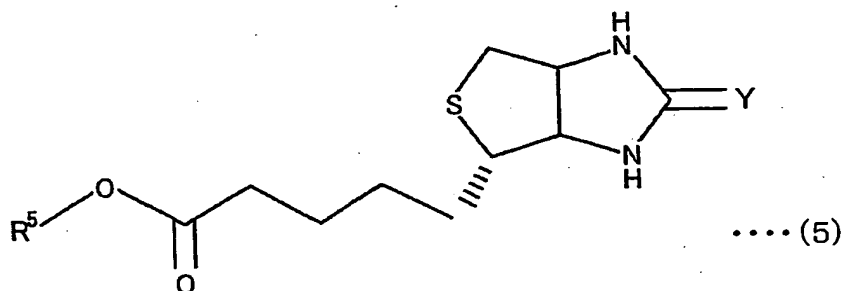
上記リンカー化合物は、以下に示す製造方法によって製造される。すなわち、上記リンカー化合物は、ビオチン系化合物と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を4鎖有するアミン化合物との縮合反応を行い、その後、上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護することによって製造される。

上記ビオチン系化合物としては、下記一般式（5）

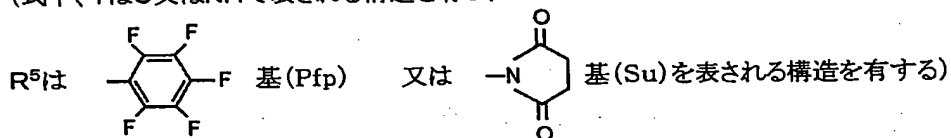
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

17



(式中、YはO又はNHで表される構造を有し、



にて表される構造を備えている化合物を挙げることができる。上記ビオチン系化合物は、ペンタフルオロフェニル基(Pfp)又はスクシンイミド基(Su)を有するエステル化合物である。そのため、上記ビオチン系化合物は、これらの置換基によって活性化されているので、アミン化合物の二級アミノ基(−NH基)と反応することができる。

また、上記アミン化合物は、二級アミノ基と、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有する分岐鎖とを含んでいれば特に限定されるものではなく、上記したリンカー化合物の多分岐部位(一般式(1)のX)に相当する構造を有していればよい。

従って、上記分岐鎖は、上記した炭化水素誘導鎖に含まれる芳香族アミノ基の代わりに、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有する以外は、上記炭化水素誘導鎖に含まれる構造を有していればよい。つまり、上記分岐鎖は、炭素及び水素からなる炭化水素鎖にて、一部の炭素や水素が他の原子や置換基に置き換わっていてもよいものである。より具体的には、上記分岐鎖は、保護基によって保護された芳香族アミ

WO 2004/022565

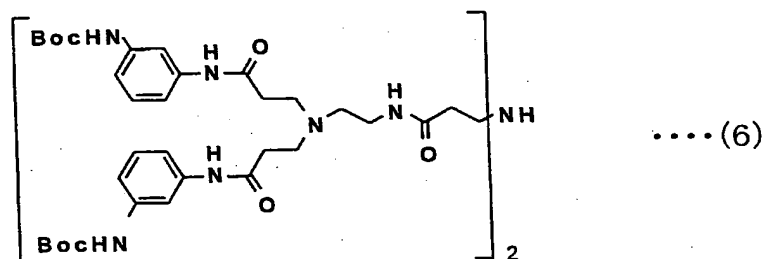
PCT/JP2003/009973

18

ノ基末端を有するとともに、炭化水素鎖の主鎖構造である炭素－炭素結合（C－C結合）の一部が炭素－窒素結合（炭素－窒素結合（C－N結合））でもよいものである。

また、上記保護基とは、芳香族アミノ基のアミノ基が上記縮合反応によって反応しないように導入される置換基である。このような保護基は、二級アミノ基の保護基を脱保護する際に影響を受けないものであれば、特に限定されるものではない。上記保護基としては、例えば、t-ブトキシカルボニル基（ $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$ 基；Boc基と記載する）、ベンジル基、アリルカルバメート基（ $-\text{COOCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 、Alloc基）等を挙げることができる。

上記アミン化合物としては、例えば、下記一般式（6）



にて表される構造を備えている化合物を挙げることができる。なお、このアミン化合物の合成方法については、後の実施例にて詳述する。

上記ピオチン系化合物とアミン化合物との縮合反応により、ピオチン系化合物のPfpやSu等の置換基と、アミン化合物の二級アミノ基とが縮合して、アミド結合が形成される。その後、芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護して、保護基を取り外し、芳香族アミノ基にすることによって、上記したリンカー化合物を得ることができる。

WO 2004/022565

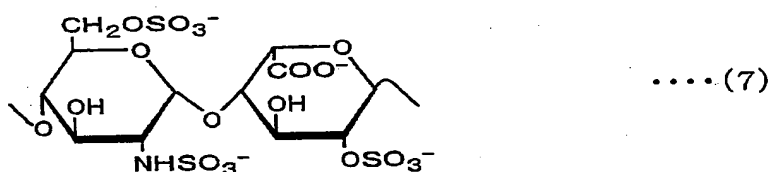
PCT/JP2003/009973

19

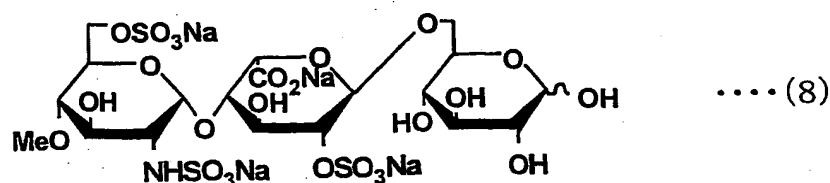
次に、上記リンカー化合物の芳香族アミノ基に、糖分子が導入されるリガンドについて説明する。本発明のリガンドは、リンカー化合物のアミノ基が、糖分子中の平衡によって生じるアルデヒド基又はケトン基と反応し、この反応によって形成されたシッフ塩基を引き続き還元することによって、芳香族アミノ基に糖分子が導入されることになる。

本発明のリガンドに含まれる糖分子は、還元糖であれば特に限定されない。糖分子としては、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース等の単糖類、結合している糖の数が2糖～10糖であるマルトース、ラクトース、後述する硫酸化オリゴ糖等のオリゴ糖類、単糖類やオリゴ糖類が組み合わされて糖数が11以上であるヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸等の多糖類を挙げることができる。

また、上記オリゴ糖類として、抗血液凝固活性を有することで知られている硫酸化多糖ヘパリン中の下記一般式(7)



にて表される特定の部分二糖構造 (G1cNS6S-I d o A2S) を有する硫酸化オリゴ糖や、該硫酸化オリゴ糖の還元末端にグルコースを結合させてなる下記一般式(8)



WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

20

にて表される構造を備えているオリゴ糖を挙げることができる。

なお、上記オリゴ糖類や多糖類は、同一の単糖分子からなる単一オリゴ糖や単一多糖であってもよく、種々の単糖分子やその誘導体からなる複合糖質や、種々の単糖分子やその誘導体、オリゴ糖類を含んでなる複合多糖類であってもよい。また、上記糖分子は、いずれも、自然界から単離・精製して得られる種々の天然の糖であってもよく、人工的に合成された糖であってもよい。

本発明のリガンドは、具体的には、前記一般式(3)にて表される構造を備えているものである。この一般式(3)にて表される構造を備えているリガンドは、前記一般式(1)にて表され、Xが前記一般式(2)にて表される構造を備えているリンカー化合物に、糖分子としてグルコースまたはマルトースまたはラクトースを導入してなるものである。一般式(2)にて表されるXは、4鎖の炭化水素誘導鎖を含む構造を備えている。この各炭化水素誘導鎖の芳香族アミノ基には、1単位又は2単位の糖分子を導入することができる。そのため、一般式(3)にて表される構造を備えているリガンドは、上記リンカー化合物に4単位以上8単位以下の糖分子が結合したものとなる。なお、上記一般式(3)において、 m^1 、 m^2 は、一般式(2)中の m^1 、 m^2 と同様に、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、互いに同じ整数であってもよい。また、 n^1 、 n^2 は、一般式(2)中の n^1 、 n^2 と同様に、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、互いに同じ整数であってもよい。また、 $p^1 \sim p^4$ は、一般式(2)中の $p^1 \sim p^4$ と同様に、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、一部あるいは全てが同

WO 2004/022565

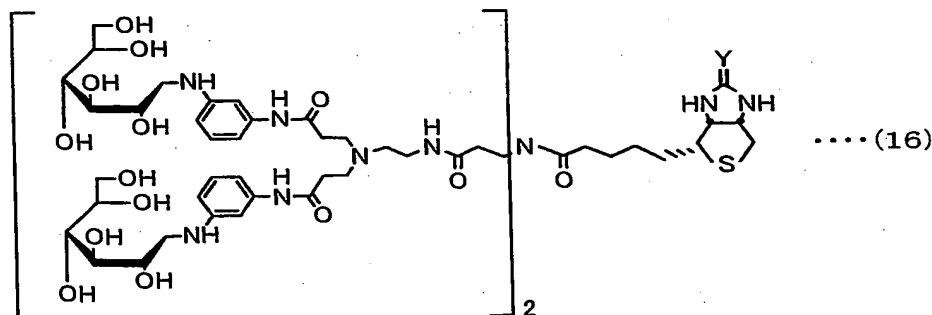
PCT/JP2003/009973

21

じ整数であってもよい。

上記リンカー化合物の炭化水素誘導鎖の芳香族アミノ基に導入される糖分子としては、グルコース、マルトース、ラクトースからなる群から選ばれる1つ以上の糖分子を挙げることができる。従って、一般式(3)にて表される構造を備えているリガンドは、一般式(3)の $R^7 \sim R^{10}$ の構造に応じて、上記リンカー化合物に、グルコース、マルトース、ラクトースからなる群から選ばれる糖分子が、4単位以上8単位以下導入されている構造を有している。

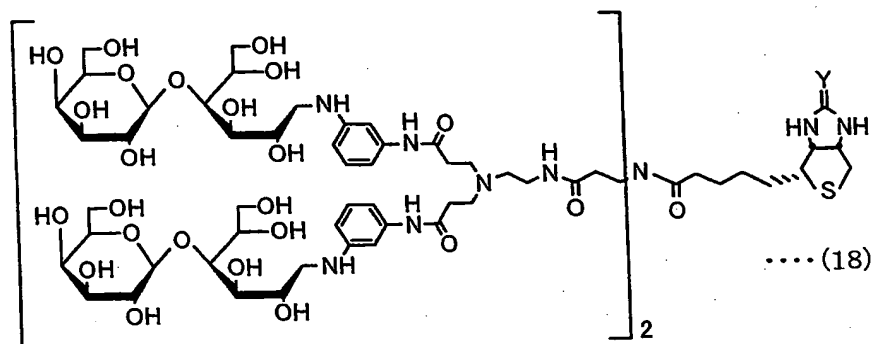
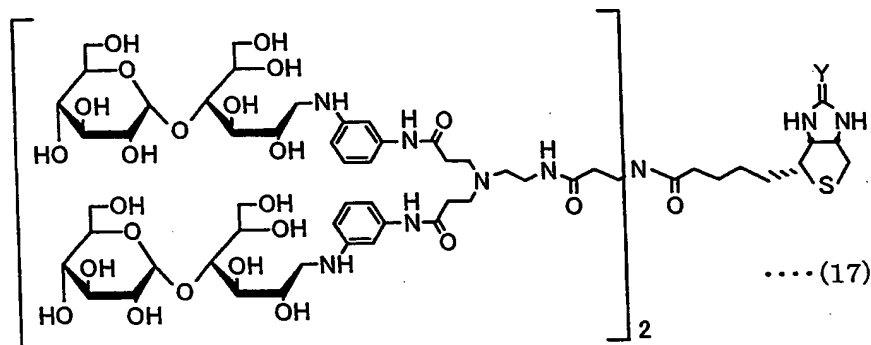
なお、上記リンカー化合物の炭化水素誘導鎖の各芳香族アミノ基に導入される糖分子は、互いに異なってもよく、一部または全てが同じであってもよいが、糖分子の導入の簡便性の点から、全て同じであることが好ましい。それゆえ、例えば、一般式(3)における $m^1, m^2, n^1, n^2, p^1, p^2, p^3, p^4$ が全て2で、リンカー化合物に4単位の糖分子が導入される場合に、糖分子がグルコースであれば、下記一般式(16)で表されるリガンドが好ましい。同様に、4単位の糖分子が導入される場合に、糖分子がマルトースであれば、下記一般式(17)で表されるリガンドが好ましく、糖分子がラクトースであれば、下記一般式(18)で表されるリガンドが好ましい。



WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

2 2



一般式 (16) ~ (18) 中、YはO又はNHで表される構造を有する。

また、本発明の他のリガンドは、前記一般式 (4) にて表される構造を備えているものである。この一般式 (4) にて表される構造を備えているリガンドは、前記一般式 (1) にて表され、Xが前記一般式 (2) にて表される構造を備えているリンカー化合物に、上記一般式 (8) にて表される構造を備えている糖分子を導入してなるものである。一般式 (2) にて表されるXは、4鎖の炭化水素誘導鎖を含む構造を有しているので、一般式 (4) にて表される構造を備えているリガンドは、上記リンカー化合物に4単位の糖分子が結合したものとなる。なお、上記一般式 (4) において、 m^1 、 m^2 は、一般式 (2) 中の m^1 、 m^2 と同様に

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

23

、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であつてもよく、互いに同じ整数であつてもよい。また、 n^1 、 n^2 は、一般式(2)中の n^1 、 n^2 と同様に、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であつてもよく、互いに同じ整数であつてもよい。また、 $p^1 \sim p^4$ は、一般式(2)中の $p^1 \sim p^4$ と同様に、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であつてもよく、一部あるいは全てが同じ整数であつてもよい。

上記のリガンドは、いずれもリンカー化合物と糖分子とを含んでなっているので、リンカー化合物内のビオチン部位にて、アビジンを有しているタンパク質分析用の支持体と、ビオチン-アビジン結合により結合することができる。これにより、このビオチン-アビジン結合を介して、上記支持体表面に4単位の糖分子を集合化して固定化されてなるリガンド担持体を提供することができる。よって、上記リガンドを用いることによって、例えばタンパク質分析用の支持体表面に2次元的に複数の糖分子を再現性よく配列してリガンド担持体を得、該リガンド担持体を用いることによって、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。それゆえ、本発明のリガンドは、SPRやアフィニティクロマトグラフィ、バイオプローブ等にて、種々の糖分子を簡単に導入するために好適に用いることができる。

このように、本発明のリガンドを、ビオチン-アビジン結合を介して支持体の表面に固定化させてなるリガンド担持体も本発明に含まれる。このリガンド担持体はタンパク質分析の用途に限定されず、糖分子との相互作用を調べるための、タンパク質以外の物質の分析の用途として用いることもできる。

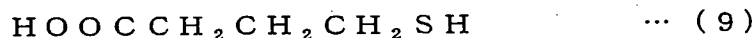
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

24

上記リガンドは、該リガンドを含むリガンド溶液に、アビジンを固定したタンパク質分析用の支持体を所定時間浸漬する、あるいは、上記支持体にリガンド溶液を注入することによって、上記支持体表面に導入することができ、上記支持体表面に4単位以上の糖分子を集合化して固定化されてなるリガンド担持体を提供することができる。

例えば、SPRのセンサチップに、上記リガンドを導入してなるリガンド担持体を得る場合には、まず、アビジンを固定したセンサチップを作成する。すなわち、図1(a)に示すように、表面に金(Au)がコーティングされたガラス基板1を用いる。次いで、図1(b)に示すように、下記一般式(9)



にて表される構造を備えている4-チオ酪酸を、金-硫黄結合(Au-S結合)を利用して、ガラス基板1上に固定する。なお、この4-チオ酪酸を固定したガラス基板1に代えて、カルボキシル基を有するポリマーがコートされた基板を用いてもよい。

続いて、図1(c)に示すように、カルボジイミド試薬の存在下にて、ガラス基板1上に固定された4-チオ酪酸と、N-ヒドロキシコハク酸イミドとを反応させる。その後、N-ヒドロキシコハク酸イミド部位と、アビジン2が有する末端アミノ基とを縮合させて、図1(d)に示すように、アビジン2をガラス基板1上に固定化する。これにより、アビジンをガラス基板1上に固定したセンサチップが得られる。

次いで、このセンサチップを、本発明のリガンドが含まれるリガンド溶液に接触させる。具体的には、上記センサチップをリガンド溶液に浸漬する、あるいは、センサチップ表面にリガンド溶液を流す。これによ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

25

り、特異的な相互作用として知られているビオチン-アビジン結合によって、図2(a)に示すように、上記センサチップ上にリガンド3を固定化したリガンド担持体4を得ることができる。

なお、リガンド溶液に用いる溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、PBS（リン酸緩衝溶液）等の緩衝液を挙げることができる。リガンド溶液に浸漬する場合の浸漬時間は、0.5時間～1.5時間程度であればよい。また、リガンド溶液を注入する場合の注入量は、0.006mg～0.06mg程度であればよい。

上記のように、リガンド3を固定化してなるリガンド担持体4を用い、該リガンド担持体とタンパク質5とを接触させ（図2(b)）、常法に従って、表面プラズモン共鳴装置を用いて共鳴角度を測定すれば、該リガンド担持体4とタンパク質5との結合挙動を観測することができる。なお、SPR測定に用いるセンサチップとしては、例えば、ガラス、プラスチック等を用いることができ、特にガラスが好適に用いられる。また、リガンド担持体とタンパク質の接触は、例えば、タンパク質をランニングバッファーに溶解した溶液を、該リガンド担持体の表面に流入する、あるいは、上記タンパク質をランニングバッファーに溶解した溶液中に、上記リガンド担持体を浸漬することにより行えばよい。このランニングバッファーとしては、例えば、PBS等の緩衝溶液を挙げることができる。

また、例えば、アフィニティクロマトグラフィに用いるアフィニティカラムとして、上記リガンドを導入したリガンド担持体を得る場合、まず、アビジンを固定したカラムを作成する。この作成方法は、常法（例えば、文献；アマシャムファルマシアバイオテク株式会社編、「初めて

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

26

の「リガンドカップリングハンドブック」(2002年)等参照)にて行えばよい。例えば、アミノ基を持つ化合物を固定化させるのに適した担体を充填してあるカラム(例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドが固定化されたゲル担体を充填してあるカラム)に、アビジン含有溶液を流すことで、上記担体にアビジンを固定化させることができる。このアビジンを固定化されてなる担体(以下、アビジン付加体)に、本発明のリガンドが含まれるリガンド溶液を注入する。これにより、特異的な相互作用として知られているビオチン-アビジン結合によって、アビジン付加体にリガンドを固定化してなるリガンド担持体を得ることができる。

なお、上記アビジン含有溶液に用いられる溶媒としては、例えば、塩化ナトリウム含有の酢酸ナトリウム水溶液等を挙げることができる。また、上記リガンド溶液に用いる溶媒としては、例えば、PBS等の緩衝液を挙げることができる。

このように、本発明のリガンドは、ビオチン部位を有しているので、上記のように例えば、タンパク質分析用の支持体表面に、一段階にて簡単に糖分子を導入して固定化することで本発明のリガンド担持体を得ることができる。

上記のように、リガンドを固定化してなるリガンド担持体を有するアフィニティカラムを用いて、アフィニティクロマトグラフィを行うには、以下のようにすればよい。すなわち、アビジンを固定化してなる担体(アビジン付加体)が充填されてなるアフィニティカラムに、タンパク質溶液を注入し、常法に従って、アフィニティクロマトグラフィを行えば、リガンド担持体に結合するタンパク質と、結合しないタンパク質とを分離することができる。なお、上記タンパク質溶液に用いられる溶媒

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

27

としては、例えば、PBS等の緩衝溶液が挙げられる。また、リガンド担持体に結合しないタンパク質の、アフィニティカラムからの溶出に用いられる溶出用溶液としては、例えば、PBS等の緩衝溶液を用いればよい。

なお、上記のようにSPR法のセンサチップや、アフィニティカラムクロマトグラフィに用いるアフィニティカラムに充填されるアビジン付加体等の支持体に糖分子を導入する方法も本発明に含まれる。

以上のように、本発明のリガンド担持体は、上記リガンドを有しているので、支持体表面に2次元的に複数の糖分子を再現性よく配列することができる。それゆえ、糖分子の生物活性を再現性よく観測でき、糖分子の構造の解明や、糖分子の生物活性について定量的な評価を行うことができる。

また、支持体表面に糖分子が固定化されているセンサチップを用いて、糖分子の特異的な相互作用を検出するSPR測定方法も本発明に含まれる。これは、末端構造が異なる糖分子が導入されてなる少なくとも2つのセンサチップを用いて、糖分子とタンパク質等の物質との相互作用を観測する。なお、糖分子の末端とは、センサチップに固定されていない側のことである。また、糖分子との相互作用を観測する物質は、タンパク質に限定はされない。

上記の方法を用いて、糖分子の種類の異なる2つのセンサチップを用いてSPR測定を行うには、例えば、以下のように行えばよい。第1の糖分子が支持体表面に固定化されてなる第1のセンサチップと、上記第1の糖分子とは末端構造が異なる第2の糖分子が支持体表面に固定化されてなる第2のセンサチップを用意する。これは、上記したように、セ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

28

ンサチップ上にリガンドを固定化したリガンド担持体（センサチップ）を作成したのと同様に得られる。これらのセンサチップは、固定化される糖分子が異なっているリガンドを用いればよい。比較する糖分子には、例えば、ラクトースとグルコース、マルトースとグルコース、コージビオースとグルコース等が挙げられる。センサチップに固定化される糖分子が異なっているリガンドは、例えば、上記一般式（16）～（18）に示すリガンドが挙げられる。なお、リガンドは本発明のものに限らず別のリガンドを用いてもかまわない。

そして、例えば、第1の糖分子に特異的に作用するタンパク質等を用いて、測定条件を一定にして、上記2つのセンサチップに作用させ、両者の共鳴角度を観測する。この両者の共鳴角度の差を検出することで、糖分子とタンパク質等との特異的な相互作用として測定することができる。

上記では、2つの種類のセンサチップ同時に測定したが、これに限定されることはなく、2種類以上のセンサチップを測定してもかまわないし、同時に測定しなくてもかまわない。また、少なくとも1つのセンサチップに糖分子を導入していないものを用いてもよい。例えば、リンカー化合物のみを固定化したものを用いてもよい。

このように、本発明のSPR測定の方法は、非特異的な相互作用を低減して、糖分子と他の物質との特異的な相互作用を測定することができる。

以下、実施例および比較例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

なお、下記の実施例において、各種のスペクトル、旋光度の測定、電

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

29

気泳動には次の機器を使用した。

- *) 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル : JEOL EX 270, JNM-LA 500 NMR spectrometer (商品名)
- *) 質量分析 : Mariner (登録商標) Biospectrometry (登録商標) Work station (商品名、ESI-TOF MS, PE Biosystems, CA, USA) VOYAGER-DERP (商品名、MALDI-TOF MS, PE Biosystems, CA, USA)
- *) 旋光度 : Perkin Elmer model 241 polarimeter (商品名)
- *) 紫外可視分光光度計 : JASCO V-530 UV/Vis spectrophotometer (商品名)
- *) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー : SPR670 (商品名、Nippon Laser & Electronics LAB)
- *) 電気泳動装置 : ATTO CompactPAGE AE-7300 (商品名)
- *) 電気泳動用既成ゲル : ATTO PAGEL-Compact AE-6000 (12.5%) Lot : 244S024 (商品名)

また、クロマトグラフィには次のシリカゲルを用いた。

- *) 薄層クロマトグラフィ : Merck Silica gel 60 F254 (No. 5715) (商品名)
- *) 調製の薄層クロマトグラフィ : Merck Silica gel 60 F254 (No. 5744) (商品名)
- *) 中圧カラムクロマトグラフィ : Merck Silica gel 60 (No. 9385, 0.040-0.063mm, 230-400 mesh) (商品名)

[実施例 1・リンカー化合物の合成]

本発明のリンカー化合物は、以下の手順にて合成した。

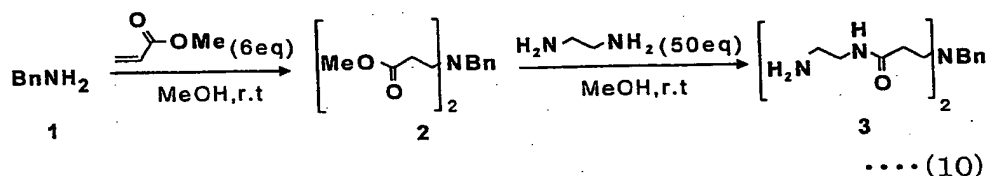
下記一般式 (10) にて示すように、室温条件下、メタノール (式中

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

30

、MeOH) 中にて、ベンジルアミン (化合物 1、式中 Bn はベンジル基を表す) と、6 当量のアクリル酸メチルとを反応させて、上記ベンジルアミンに 2 単位のアクリル酸メチルをマイケル付加させ、収率 93% にて化合物 2 を得た。その後、室温条件下にて、該化合物 2 が含まれているメタノール中に、大過剰 (50 当量) のエチレンジアミンを加え、該エチレンジアミンを化合物 2 に縮合させて、化合物 3 を得た。なお、大過剰 (50 当量) のエチレンジアミンを加えるのは、エチレンジアミンの 2 つのアミノ基に同時に化合物 2 が縮合するのを防ぐためである。



化合物 2 を得るために、具体的には、ベンジルアミン (4.7 mL, 44.6 mmol) のメタノール溶液 (143 mL) にアクリル酸メチル (8.52 mL, 104 mmol) を加えて室温で窒素雰囲気下 8 時間攪拌し、アクリル酸メチルを (3.87 mL, 47 mmol) 追加し 12 時間室温で攪拌した。この攪拌した溶液に、その後、さらにアクリル酸メチルを (7.47 mL, 94 mmol) 加え終夜攪拌し、メタノール/アクリル酸メチル反応溶液を得た。メタノール/アクリル酸メチル反応溶液を減圧濃縮し、残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィ (300 g, トルエン : 酢酸エチル = 5 : 1 ~ 3 : 1) で精製して、無色オイル状溶液として化合物 2 を得た。

得られた化合物 2 は、収量 11.7 g (収率 95%) であった。また、得られた化合物 2 の ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 測定を行ったところ、 δ 7.28-7.20 (5H, m, aromatic), δ 4.79 (6H, s, $\text{OMe}^* \times 2$), δ 3.57 (2H,

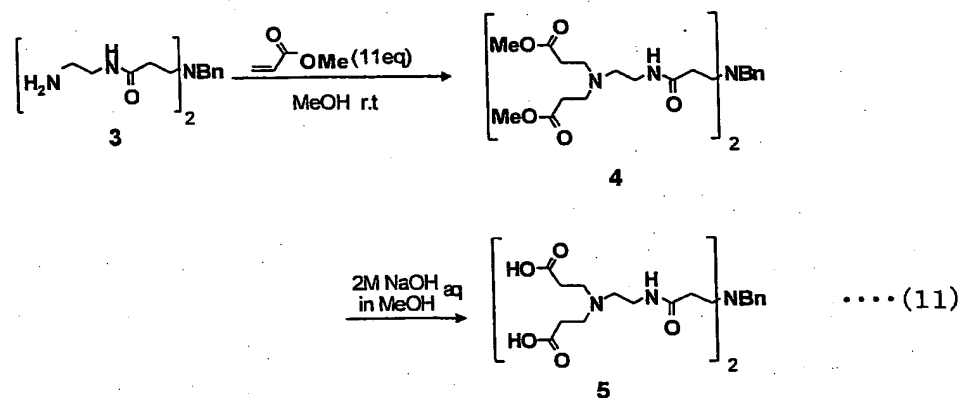
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

31

d, $J = 4.6$ Hz, NCH_2^*Ph), δ 2.76 (4H, td, $J_{\text{gem}} = 4.6$, $J_{\text{vic}} = 6.8$ Hz, CH_2^*NBn), δ 2.46 (4H, td, $J_{\text{gem}} = 4.6$, $J_{\text{vic}} = 6.8$ Hz, $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{NBn}$)であった。なお、各化学シフト δ は、Hが複数存在するものには*を付けたプロトン、つまり H^* 、に対する測定値を示しており、以下の記載についても同様である。また、ESI-MS (positive) 測定 (飛行時間型質量分析計測定) を行ったところ、 m/z (質量/電荷比) 302.1 [$(\text{M}+\text{Na})^+$] であった。

続いて、下記一般式 (11) にて示すように、上記化合物 3 が含まれているメタノール中に、室温条件下にて、11当量のアクリル酸メチルを加えて、化合物 3 にアクリル酸メチルを4単位付加し、収率81%にて化合物 4 を得た。その後、メタノールに2Mの水酸化ナトリウム水溶液を添加したアルカリ条件下にて、化合物 4 のメチルエステルを加水分解し、末端にカルボキシル基 ($-\text{COOH}$ 基) を4単位有する化合物 5 を収率96%にて得た。



化合物 4 を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、化合物 2 (9.97 g, 35.7 mmol) をメタノール (120 mL) に溶解させ、窒素雰囲気下 0 °C で 5 分攪拌し、これに無水エチレンジアミン (60 m

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

32

L, 1.11 mol) を加え 0 °C で 50 分攪拌後、室温で終夜攪拌し、さらに無水エチレンジアミン (50 mL, 0.93 mol) を加え室温で終夜攪拌して、化合物 2 / 無水エチレンジアミン反応溶液を得た。この化合物 2 / 無水エチレンジアミン反応溶液を濃縮し、黄色オイル状残渣を得た。この黄色オイル状残渣に、メタノール (120 mL) を加えて溶解させ、アクリル酸メチル (19.3 mL, 234 mmol) を加えて室温で終夜攪拌し、さらにアクリル酸メチル (19.3 mL, 234 mmol) を加えて室温で終夜攪拌し、黄色オイル状残渣 / アクリル酸メチル反応溶液を得た。この黄色オイル状残渣 / アクリル酸メチル反応溶液を減圧濃縮し、残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィ (700 g, クロロホルム:メタノール = 20 : 1 ~ 7 : 1) で精製して、化合物 4 として黄色オイル状溶液を得た。

得られた化合物 4 の収量は、24.5 g (収率 81%) であった。また、得られた化合物 4 の ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 測定を行ったところ、 δ 7.29-7.28 (5H, m, aromatic H), δ 3.66 (12H, s, $\text{OMe}^* \times 4$), δ 3.27 (4H, q, $J = 6.1$ Hz, $\text{CH}_2^* \text{NHCO}$), δ 2.81 (4H, t, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2^* \text{NBn}$), δ 2.75 (8H, t, $\text{CH}_2 \times 4$, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2^* \text{NCH}_2$), δ 2.52 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 5.9, 6.1$ Hz, $\text{CH}_2^* \text{CH}_2 \text{NHCO}$), δ 2.41 (12H, t, $\text{CH}_2 \times (2+4)$, $J = 6.8, 6.6$ Hz, $\text{NCOCH}_2^* \text{CH}_2 \text{NHCO}$, MeOCOCH_2^*) であった。また、ESI-MS (positive) m/z 680.4 [$(\text{M}+\text{H})^+$] であった。

また、化合物 5 を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、化合物 4 (1.0 mg, 1.47 mmol) をメタノール (7.4 mL) に溶解させ、これに 4 M 水酸化ナトリウム水溶液 (7.4 mL) を加えてアルゴンガス雰囲気下 0 °C で 2 時間攪拌し、化合物 4 / 水酸化ナトリウム反応溶液を得た。この化合物 4 / 水酸化ナトリウム反応溶液に 4 M 塩酸 (7

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

33

mL) を加えて pH 試験紙で pH 3 を確認後、化合物 4 / 水酸化ナトリウム反応溶液を減圧濃縮し、残渣の水溶液を凍結乾燥させた。得られた凍結乾燥させた残渣を、HP-20 (300 mL, H₂O ~ H₂O : メタノール = 1 : 1 ~ メタノール) で精製し、H₂O / メタノールで溶出させた画分を集め減圧濃縮した。その後、減圧濃縮した残渣を凍結乾燥して、化合物 5 として淡黄色結晶を得た。

得られた化合物 5 は、収量 878 mg (収率 96%) であった。また、得られた化合物 5 の ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) 測定を行ったところ、 δ 7.54-7.38 (5H, m, aromatic H), δ 3.60 (2H, s, NCH₂*Ph), δ 3.58 (2H, t, J = 6.1 Hz, CH₂*NHC(O)), δ 3.34-3.24 (16H, m, CH₂×8, CH₂*NBn, MeO COCH₂CH₂*N, NCH₂CH₂*NHC(O)), δ 2.79 (4H, t, CH₂×2, J = 7.0 Hz, COCH₂*CH₂NBn), δ 2.60 (8H, t, CH₂×4, J = 6.4 Hz, MeOCOCH₂*) であった。また、ESI-MS (positive) m/z 624.3 [(M+H)⁺] であった。

なお、本実施例では、化合物 5 はカルボキシル基が 4 単位のものまでしか合成していないが、必要であれば、化合物 4 のメチルエステルを加水分解せずに、エチレンジアミンを再び縮合させ、アクリル酸メチルを付加させる反応を続ければ、末端に 8、16、32 単位のカルボキシル基を有する骨格構造を容易に合成することが可能である。

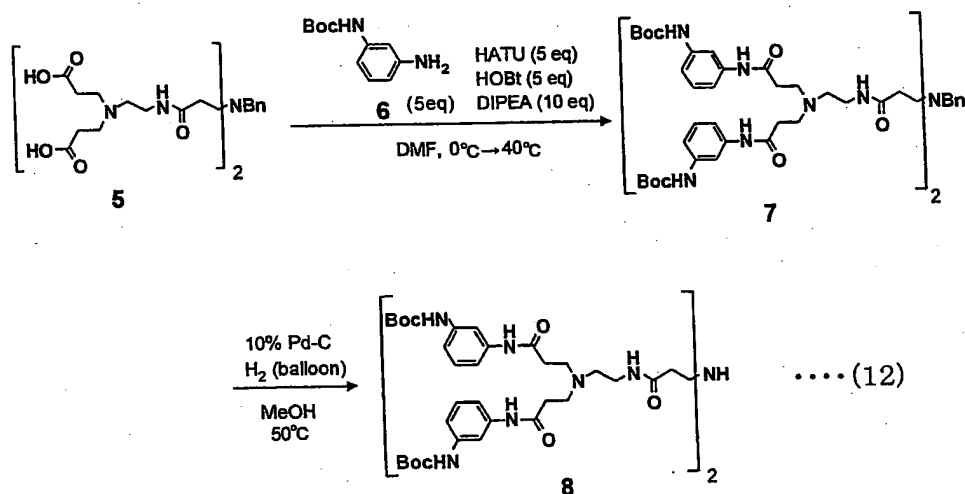
次いで、下記一般式 (12) にて示すように、5 当量の 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (式中、HOBt) 及び、10 当量のジイソプロピルエチルアミン (式中、DIPEA) を含む N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 中にて、0℃ から 40℃ に温度変化させながら、活性化剤として 5 当量の o-[7-アザベンゾトリアゾール-1-イル]-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

34

エート（式中、HATU）を用いて、上記化合物5の末端のカルボキシル基に、一方のアミノ基が α -ブトキシカルボニル基（式中Boc、以下、Boc基と記載）にて保護されたフェニレンジアミン誘導体（化合物6、5当量）を縮合させて、化合物7を得た（収率57%）。続いて、水素雰囲気下、50℃のメタノール中にて、パラジウム（10%のPd-C）を用いて化合物7の接触還元を行って、該化合物7の二級アミノ基の保護基であるベンジル基を脱保護し、収率80%にて化合物8を得た。



化合物6を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、 m -フェニレンジアミン（7.81 g, 72.2 mmol）をメタノール（240 mL）に溶解させ、 α -ブトキシカルボネート（16.5 mL, 71.8 mmol）と、トリエチルアミン（10 mL, 71.5 mmol）とを加え、アルゴンガス雰囲気下、遮光して0℃で30分攪拌し、その後室温で終夜攪拌し、 m -フェニレンジアミン反応溶液を得た。この、 m -フェニレンジアミン反応溶液を減圧濃縮して、残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィ（500

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

35

g, クロロホルム：メタノール = 10 : 1 ~ 7 : 1) で精製して、化合物 6 として黄白色結晶を得た。

得られた化合物 6 は、収量 13.3 g (収率 88%) であった。また、得られた化合物 6 の ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 測定を行ったところ、 δ 7.03 (1H, dd, $J = 7.8, 8.1$ Hz, aromatic H), δ 6.54 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, aromatic H), δ 6.36 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, aromatic H), δ 3.67 (2H, s, NH_2), δ 1.51 (9H, m, $\text{CH}_3 \times 3$ of BOC) であった。また、ESI-MS (positive) m/z 209.1 $[(\text{M}+\text{H})^+]$ であった。

また、化合物 7 を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、化合物 5 (54.8 mg, 87.9 μmol) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (66.4 mg, 492 μmol) とを無水ジメチルフォルムアミド (0.9 mL) に窒素雰囲気下で溶解させて、0 $^\circ\text{C}$ で 15 分攪拌し化合物 5 / 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール反応溶液を得た。この化合物 5 / 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール反応溶液に、HATU (168 mg, 441 μmol) とジイソプロピルエチルアミン (150 mL, 882 μmol) と化合物 6 (98.2 mg, 471 μmol) とを加えて室温で終夜攪拌し、50 $^\circ\text{C}$ で 5 時間攪拌して化合物 5 / 化合物 6 反応溶液を得た。この化合物 5 / 化合物 6 反応溶液を減圧濃縮し、残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィ (80 g, クロロホルム：メタノール = 15 : 1 ~ 5 : 1) で精製して、化合物 7 として白色結晶を得た。

得られた化合物 7 は、収量 69.2 mg (収率 57%) であった。また、得られた化合物 7 の ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 測定を行ったところ、 δ 7.39 (4H, s, $1\text{H} \times 4$, aromatic H), δ 7.39-6.53 (21H, m, aromatic H), δ 3.63 (2H, s, NCH_2^*Ph), δ 3.15 (4H, d, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 6.2$ Hz, CH_2^*N)

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

36

HCO), δ 2.76 (8H, t, $\text{CH}_2 \times 4$, $J = 6.2$ Hz, $\text{MeOCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{N}$), δ 2.49 (8H, t, $\text{CH}_2 \times 4$, $J = 6.2$ Hz, $\text{MeOCOCH}_2^*\text{CH}_2\text{N}$), δ 2.45 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 6.4$ Hz, CH_2^*NBn), δ 2.38 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 6.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{NHCO}$), δ 2.03 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 6.4$ Hz, $\text{NHCOCH}_2^*\text{CH}_2\text{NBn}$), δ 1.48 (36H, s, $\text{CH}_3 \times 12$, Me of BOC)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 693.3 [$(M+2H)^{2+}$] であった。

化合物8を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、化合物7 (49.8 mg, 36.0 μmol) に10% Pd-C (70.2 mg) のメタノール懸濁液を加え、水素雰囲気下、室温で終夜攪拌し、化合物7反応溶液を得た。化合物7反応溶液をメンブランフィルターでろ過し、ろ液を減圧濃縮して、化合物8として白色結晶を得た。

得られた化合物8は、収量36.8 mg (収率80%) であった。また、得られた化合物8の ^1H NMR (400 MHz, CD_3CD) 測定を行ったところ、 δ 7.64 (4H, s, $1\text{H} \times 4$, aromatic H), δ 7.05-6.91 (12H, m, aromatic H), δ 3.40 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 5.4$ Hz, CH_2^*NHCO), δ 3.19 (8H, br, $\text{CH}_2 \times 4$, $\text{MeOCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{N}$), δ 2.98 (4H, br, $\text{CH}_2 \times 2$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{NHCO}$), δ 2.89 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 5.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NH}$), δ 2.71-2.70 (4H, br, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 5.6$ Hz, $\text{MeOCOCH}_2^*\text{CH}_2\text{N}$), δ 2.36 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 5.4$ Hz, $\text{NHCOCH}_2^*\text{CH}_2\text{NBn}$), δ 1.39 (36H, s, $\text{CH}_3 \times 12$, Me of BOC)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 647.9 [$(M+2H)^{2+}$] であった。

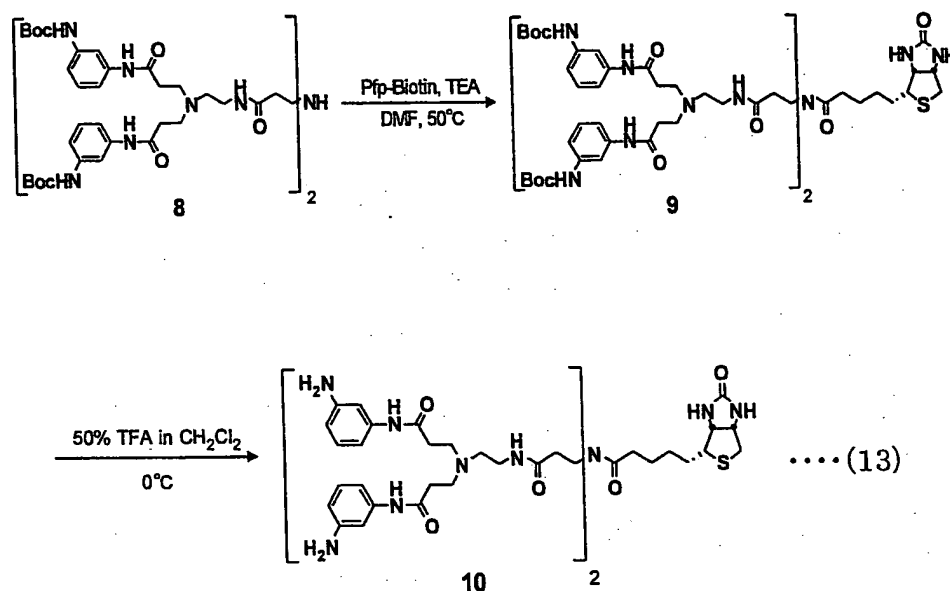
次に、下記一般式(13)にて示すように、温度50℃、トリエチルアミン(式中、TEA)の存在下、DMF中にて、脱保護されてフリーになった化合物8のアミノ基に、ペンタフルオロフェニル基(Pfp)にて活性化したビオチンを縮合させ、化合物9を得た(収率63%)。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

37

その後、0℃の温度条件下、トリフルオロ酢酸（式中、TFA）を含むCH₂Cl₂中にて、化合物9のBoc基を脱保護して、化合物10を本発明のリンカー化合物として得た。



化合物9を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、ビオチン（80.1 mg, 0.397 mmol）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（80.8 mg, 0.39 mmol）を無水ジメチルフォルムアミド（1 mL）にアルゴンガス雰囲気下、溶解させて50℃で4時間攪拌し、ペンタフルオロフェノール（120 mg, 0.65 mmol）を加えて50℃で終夜攪拌し、ビオチン反応溶液を得た。ビオチン反応溶液に化合物8（70.6 mg, 54.5 mmol）、トリエチルアミン（60 μL, 0.811 mmol）を加え、50℃で終夜攪拌し化合物8反応溶液を得た。化合物8反応溶液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチル100 mLに溶解し、飽和食塩水（50 mL×3）で洗浄後、有機相に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。この乾燥した残渣から、乾燥剤を濾去後、濾液を減圧濃縮し、残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

38

イ (25 g, クロロホルム : メタノール = 10 : 1 ~ 5 : 1) で精製して、化合物 9 として白色結晶を得た。

得られた化合物 9 は、収量 52.3 mg (収率 63%) であった。また、得られた化合物 9 の ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 測定を行ったところ、 δ 7.61 (2H, s, aromatic H), δ 7.57 (2H, s, aromatic H), δ 7.06-6.95 (1 2H, m, aromatic), δ 4.31 (1H, dd, $J_{\text{B7/B6}} = 4.3$, $J_{\text{B7/B3}} = 6.6$ Hz, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.09 (1H, dd, $J_{\text{B3/B4}} = 4.5$, $J_{\text{B3/B7}} = 6.6$ Hz, Biotin NHCH^*CHS), δ 3.35 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 3.19-3.17 (4H, m, $\text{CH}_2 \times 2$, $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$), δ 2.98-2.93 (1H, m, $J_{\text{B4/B3}} = 4.5$ Hz, Biotin NHCHCH^*S), δ 2.78-2.72 (9H, m, $\text{CH} + \text{CH}_2 \times 4$, $J_{\text{B6a/B6b}} = 10$ Hz, $J_{\text{B6a/B7}} = 4.3$ Hz, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$, $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 2.53-2.50 (4H, br, $\text{CH}_2 \times 2$, $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 2.44-2.40 (9H, m, $\text{CH} + \text{CH}_2 \times 4$, $J_{\text{B6b/B6a}} = 10$ Hz, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 2.20 (2H, t, $J_{\text{B12/B11}} = 7.6$ Hz, Biotin $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{CO}$), δ 2.16 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 1.55-1.51 (4H, br, $\text{CH}_2 \times 2$, Biotin $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CO}$), δ 1.40 (36H, s, $\text{CH}_3 \times 12$, Me of BOC), δ 1.28-1.24 (2H, m, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) であった。また、ESI-MS (positive) m/z 761.4 [$(\text{M}+2\text{H})^{2+}$] であった。

また、化合物 10 を得るために、具体的に次のような操作を行った。化合物 9 (52.3 mg, 34.4 μmol) をジクロロメタン (1.5 mL) に溶解させ、トリフルオロ酢酸 (1 mL) を加え 0 $^\circ\text{C}$ で 1 時間攪拌し、化合物 9 / トリフルオロ酢酸反応溶液を得た。この化合物 9 / トリフルオロ酢酸反応溶液を減圧濃縮し、残渣を $\text{LH}20$ (140 mL, メタノール溶出)

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

39

を用いて精製して、化合物 10 として黄色結晶を得た。

得られた化合物 10 は、収量 50.9 mg (収率 94%) であった。また、得られた化合物 10 の ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 測定を行ったところ、 δ 7.51 (4H, s, aromatic H), 7.21 (8H, s, aromatic H), δ 6.83–6.81 (4H, m, aromatic H), δ 4.32 (1H, dd, $J_{\text{B7/B6}} = 4.3$, $J_{\text{B7/B3}} = 8.0$ Hz, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.14 (1H, dd, $J_{\text{B3/B4}} = 4.4$, $J_{\text{B3/B7}} = 8.0$ Hz, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 3.59–3.52 (12H, m, $\text{CH}_2 \times 6$, $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$, $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 3.47–3.37 (4H, m, $\text{CH}_2 \times 2$, $\text{CONCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH}$), δ 3.35–3.33 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 3.02 (1H, dt, $J_{\text{B4/B9}} = 4.9$ Hz, Biotin NHCHCH^*S), δ 2.92–2.89 (8H, m, $\text{CH}_2 \times 4$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 2.79 (1H, dd, $J_{\text{gem}} = 12.8$, $J_{\text{vic}} = 5.0$ Hz, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.58 (1H, d, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.37 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CONCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONH}$), δ 2.31 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, $\text{CONCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONH}$), δ 2.21 (2H, t, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 1.48–1.19 (6H, br, $\text{CH}_2 \times 3$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2^*\text{CH}_2^*$) であった。また、ESI-MS (positive) m/z 1142.6 [$(\text{M}+\text{Na})^{2+}$] であった。また、 $[\alpha]_D^{22} = +0.947$ (c 0.972, MeOH) であった。

また、得られた化合物 10 は、ESI-MS (positive) $m/z = 1120.62$ [$\text{M}+\text{H}]^+$ であり、一般式 (13) にて化合物 10 として示す構造を有していることを確認した。また、NMR 測定を行い、得られた NMR データからも、上記化合物 10 として示す構造を有していることを確認した。

[実施例 2・リガンドの合成]

実施例 1 にて得られたリンカー化合物 (化合物 10) を用いて、前記

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

40

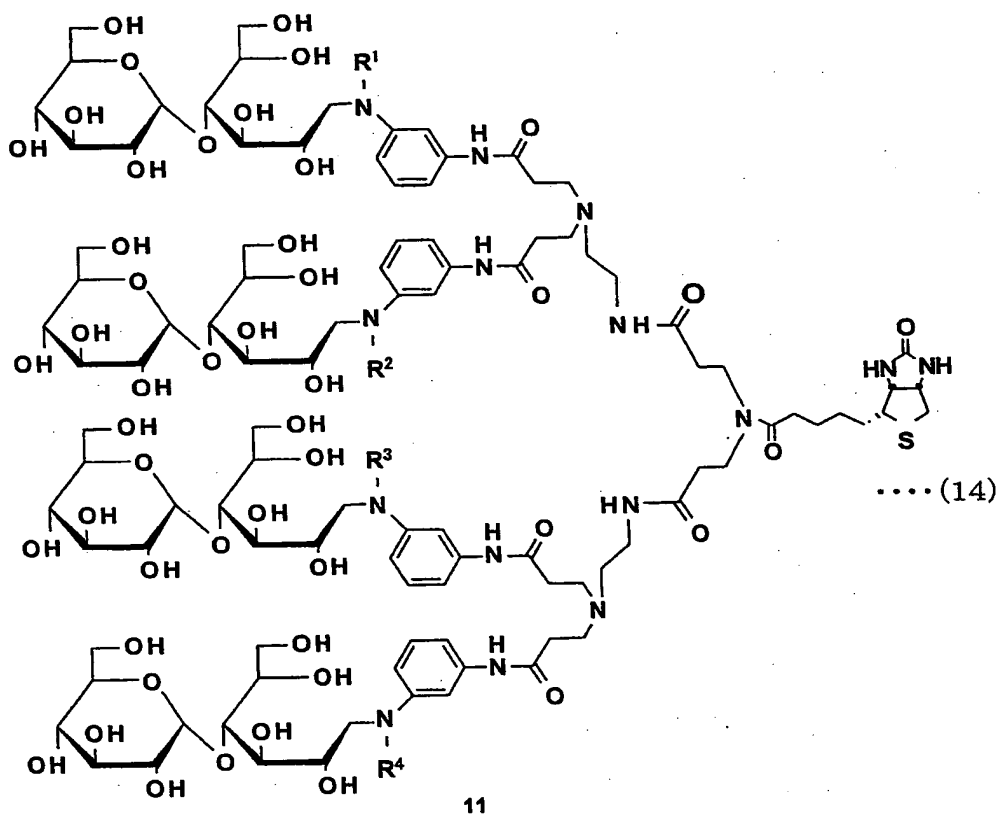
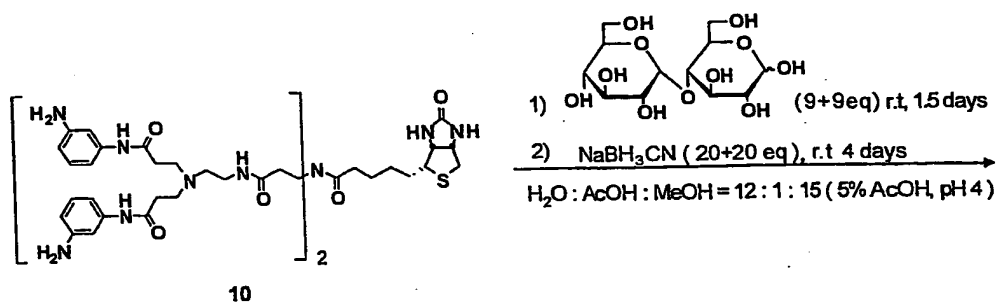
一般式(3)にて表される構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

下記一般式(14)にて示すように、溶媒として、水：酢酸(AcOH):メタノール=12:1:15(5%の酢酸溶液、 $\text{pH}4$)を用い、上記化合物10に対して、9当量のマルトースを加えて、室温にて1.5日間攪拌した。その後、飛行時間型質量分析計にて、4単位のシッフ塩基が形成されたことを確認した後、還元剤として20当量の NaBH_3CN を2回に分けて加え、室温にて4日間攪拌し、還元アミノ化反応を行った。得られた化合物を、 HP-20 (ダイアイオン)を用いて精製し、本発明のリガンドとして化合物11を得た(収率89%)。この化合物11は、マルトースが5単位~7単位集合してなる混合物として得られた。

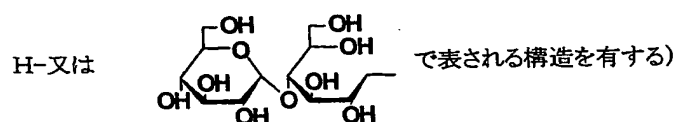
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

4 1



(式中、 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 は、それぞれ独立して、



[実施例 3・リガンドの合成]

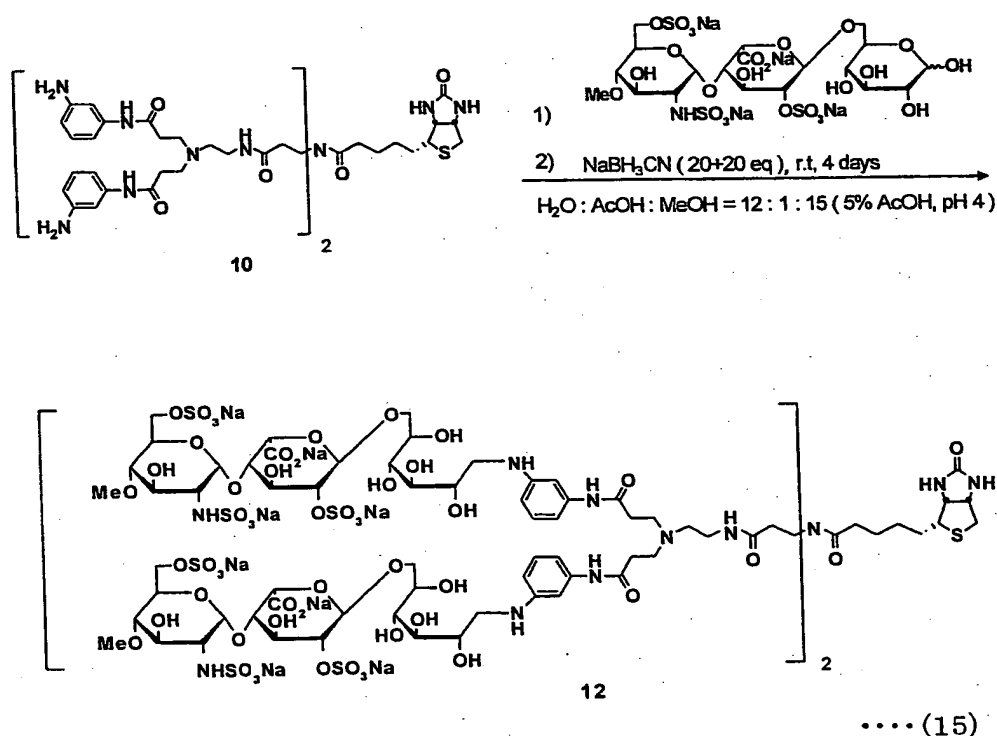
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

42

実施例 2 にて得られたリンカー化合物（化合物 10）を用いて、前記一般式（5） にて表される構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

下記一般式（15） にて示すように、マルトースに代えて、前記一般式（8） にて表される糖分子を用いた以外は、実施例 2 と同様に操作を行い、化合物 12 を得た。



具体的に化合物 12 を得るために、以下の操作を行った。すなわち、リンカー化合物 10（2.4 mg, 2.1 μmol ）と、前記一般式（8） にて表される糖分子（GlcNS6S-IdoA2S-Glcと略、11.0 mg, 12.8 μmol ）とを混合溶媒（水/酢酸/メタノール = 12/1/15, 0.4 mL）に溶解させ室温で 2 日攪拌した。リンカー化合物 10 / GlcNS6S-IdoA2S-Glc 反応溶液に

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

43

水素化シアノホウ素ナトリウム (約3 mg, 40 μ mol) を加えて室温で2日攪拌後、再び水素化シアノホウ素ナトリウム (約2 mg, 40 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌し、還元した。還元したリンカー化合物 10 / GlcNS6S-IdoA2S-Glc反応溶液を減圧濃縮し、残渣をSephadexG-50 fine [100 mL溶出液: 0.85 M食塩水+PBS(1/1 vol.)混合溶液] を用いて精製し、254 nmでのUV吸収が認められた画分を集めて濃縮し、残渣を凍結乾燥させた。ここで得た凍結乾燥させた残渣をHP-20 (60 mL) を用いて脱塩し、水/メタノール=1/1で溶出させた画分を集めて濃縮し、凍結乾燥させた。ここで得た凍結乾燥した画分をSephadexG-10 (20 mL) を用いて再度脱塩し、254 nmでのUV吸収が認められた画分を集めて濃縮し、凍結乾燥させて、化合物 12 として白色結晶を得た。

得られた化合物 12 は、収量4.99 mg (収率42%) であった。また、得られた化合物 12 の¹H NMR (500 MHz, D₂O) 測定を行ったところ、 δ 7.14-7.12 (4H, br, aromatic H), δ 6.91-6.59 (12H, br, aromatic H), δ 5.36-5.34 (4H, br, H-1''), δ 5.12 (4H, br, H-1'), δ 4.51 (4H+1H, d, J = 2.6 Hz, H-5', Biotin NHCH*CH₂S), δ 4.29 (4H \times 2, d, J_{gem} = 9.3 Hz, H-6'' b, H-2'), δ 4.19 (4H \times 3, d, J_{gem} = 9.3 Hz, H-6'' a, H-3', Biotin NHCH*CHS), δ 4.05 (4H, d, J = 2.5 Hz, H-4'), δ 4.00-3.93 (4H \times 3, m, H-5'', H-1b, H-6b), δ 3.86-3.85 (4H, m, H-5), δ 3.78-3.72 (4H, m, H-4), δ 3.70 (4H, t, H-3'), δ 3.67-3.59 (4H \times 2, m, H-3, H-6b), δ 3.56-3.52 (4H, br, Link PhNHCOCH₂CH₂NCH₂CH₂*), δ 3.42 (4H, t, J = 6.6 Hz, Link COCH₂CH₂*NCO), δ 3.36-3.30 (4H \times 2 + 8H, m, H-2, H-4''), Link PhNHCOCH

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

4 4

$_2\text{CH}_2^*\text{N}$), δ 3.25 (4H, dd, $J = 10.3, 3.3$ Hz, H-2''), δ 3.18-3.05 (1H x 2, br, H-1a, Biotin NHCHCH^{*}S), δ 2.93-2.90 (4H, br, Link PhNHCOCH₂CH₂NCH₂^{*}CH₂), δ 2.89 (1H, br, Biotin NHCHCH₂^{*}S), δ 2.82 (4H, t, $J = 6.6$ Hz, Link COCH₂^{*}CH₂NCO), δ 2.72-2.70 (1H, br, Biotin NHCHCH₂^{*}S), δ 2.58 (8H, t, $J = 6.6$ Hz, Link PhNHCOCH₂^{*}CH₂N), δ 2.05 (2H, br, Biotin COCH₂^{*}CH₂CH₂CH₂), δ 1.53 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, Biotin COCH₂CH₂CH₂CH₂^{*}), δ 1.30 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, Biotin COCH₂CH₂^{*}CH₂CH₂), δ 1.17 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, Biotin COCH₂CH₂CH₂^{*}CH₂)であった。

このように、重水 (D₂O) 中で 500 MHz で NMR 測定を行って目的物を同定した。集合化度は NMR のイズロン酸部分の 1 位プロトンと、リンカー構造内の芳香族プロトン (16 H を基準) の強度比から計算した。両者の強度比は 4.1 : 16 となり、GlcNS6S-IdoA2S-Glc が平均して 4.1 分子集合しているの見積もった。GlcNS6S-IdoA2S-Glc が n 分子集合した化合物の分子量 (Mw) は、化合物 10 の分子量 1120.4 と GlcNS6S-IdoA2S-Glc が 1 分子集合する際の分子量増加 840.97 とを用いて、式⑥のように表される。

$$Mw = 1120.4 + 840.97n \quad (\text{式⑥})$$

上式⑥に $n = 4.1$ を代入し、分子量 4568.4 を得て、これを基に収率を計算すると上記のように 42% と求められた。

[実施例 4・リガンドの合成]

実施例 1 で得られたリンカー化合物である化合物 10 (以降ビオチンリンカー 10 と呼ぶ) に関して、糖分子の集合度の違いによるレクチンとの相互作用を SPR 測定するために、リガンドを合成した。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

45

(4-1 糖分子の単位を定めていないリガンドの合成)

ビオチンリンカー10を用いて糖分子を集合化させリガンドを得た。ビオチンリンカー10はメタノールには溶解するが水には不溶なため、糖を集合させる還元アミノ化反応の溶媒は、水、酢酸、メタノールの混合溶媒とし、pH4の条件で反応を行った。

初めに、ビオチンリンカー10に集合させる糖分子としてグルコースを選択し、下記一般式(19)において化合物16にて表されるリガンドを以下の手順にて合成した。

下記一般式(19)に示すように、実施例1にて得られたビオチンリンカー10に対して8当量(1-アミノ基当たり2当量、8.0 mg, 44 μ mol)のグルコースを用い、両者を混合溶媒に溶解させて室温で終夜攪拌し、ビオチンリンカー10/グルコース反応溶液を得た。反応の追跡はESI-MS測定を行った。反応中の上記ビオチンリンカー10/グルコース反応溶液を少量取り出しメタノールで希釈したサンプルを測定して、シッフ塩基の形成を確認したところ、この段階では大部分のビオチンリンカー10はアミノ基が遊離のまま存在し、シッフ塩基の生成率は小さかった。そこで上記ビオチンリンカー10/グルコース反応溶液に、グルコースを順次追加し、最終的に28当量のグルコースを反応させると、ESI-MS測定の結果、ビオチンリンカー10は、シッフ塩基の形で存在していることが分かった。なおビオチンリンカー10に4残基あるアミノ基すべてがシッフ塩基になったわけではなく、それ以外に3、または2、または1残基のアミノ基だけがシッフ塩基になった化合物も存在していた。

この段階で、ビオチンリンカー10/グルコース反応溶液に還元剤と

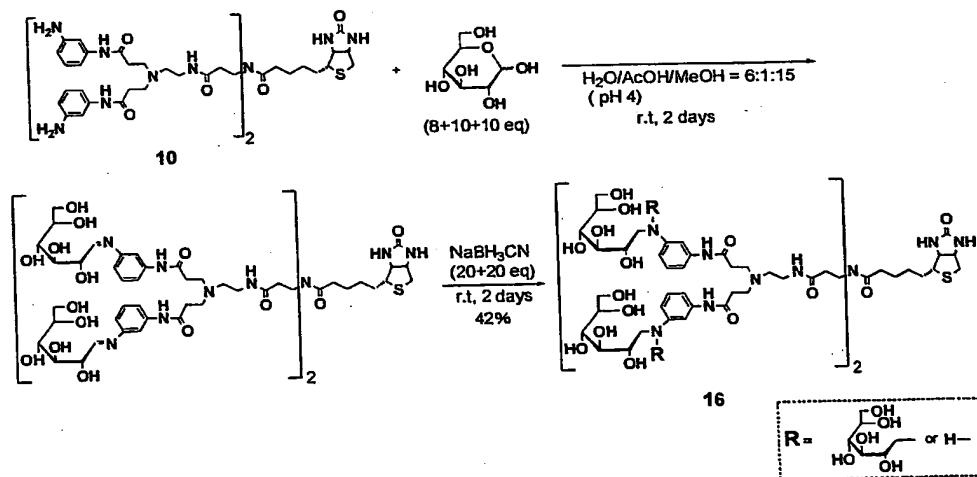
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

46

して水素化シアノホウ素ナトリウムを加え、シッフ塩基を還元した。還元反応終了後、HP-20（商品名）を用いて、還元したビオチンリンカー10/グルコース反応溶液を精製して、本発明のリガンドとして化合物16を得た。

得られた化合物16をESI-MS測定したところ、グルコースが7または8分子集合した化合物が合成されていたことが分かった。これはグルコースを大過剰に加えたため、シッフ塩基が還元されて生じた2級アミノ基に、さらにグルコースが反応したためである。ESI-MS測定の結果から、上記化合物16は、グルコースを7または8単位（分子）有するリガンドの混合物であることがわかった。なお得られた上記化合物16の収率は、化合物が8分子集合体であると仮定した場合、42%である。この化合物16を以下8-Glcと略称する。



....(19)

化合物16を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

47

ち、ビオチンリンカー10 (6.0 mg, 5.4 μ mol) とグルコース (8.0 mg, 44 μ mol) とを混合溶媒 (水/酢酸/メタノール = 6/1/15, 0.4 mL) に溶解させて室温で終夜攪拌後、グルコース (10 mg, 55 μ mol) を追加し、6時間後に再びグルコース (10 mg, 55 μ mol) を加えて終夜攪拌し、ビオチンリンカー10/グルコース反応溶液を得た。このビオチンリンカー10/グルコース反応溶液に、水素化シアノホウ素ナトリウム (10 mg, 160 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌し、還元反応させた。この還元反応させたビオチンリンカー10/グルコース反応溶液を減圧濃縮し、残渣をHP-20 (70 mL) を用いて精製し、水/メタノール = 1/1 で溶出させた画分を集めて濃縮し、凍結乾燥させて、化合物16として白色結晶を得た。

得られた化合物16は、収量5.1 mg (収率42%, 8置換体として計算) であった。また、得られた化合物16の ^1H NMR (400 MHz, D_2O) 測定を行ったところ、 δ 6.92 (4H, d, $J = 7.6$ Hz, aromatic H), δ 6.73 (4H, s, aromatic H), δ 6.50-6.45 (8H, br, aromatic H), δ 4.30-4.27 (1H, m, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.05-4.02 (1H, br, Biotin NHCH^*CHS), δ 3.95-3.91 (8H, m, H-2'), δ 3.76-3.71 (8H, m, H-5'), δ 3.65-3.59 (8H \times 2, m, H-3', H-6' b), δ 3.58-3.45 (8H \times 3, m, H-6' a, H-4', H-1' b), δ 3.25 (8H, dd, $J_{\text{gem}} = 15.0$, $J_{\text{vic}} = 9.6$ Hz, H-1' a), δ 3.19-3.16 (8H, br, Link $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), δ 2.96-2.86 (1H, m, Biotin NHCHCH^*S), δ 2.72-2.68 (9H, br, $\text{CH}_2 \times 4 + 1\text{H}$, Link $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{NHCOPh}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.54-2.49 (5H, br, $\text{CH}_2 \times 2 + 1\text{H}$, Link $\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOPh}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.41 (8H, br, $\text{CH}_2 \times 4$, Link $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), δ 2.07 (2H, br, Biotin

48

COCH₂*CH₂CH₂CH₂), δ 2.00 (4H, br, Link NHCCH₂CH₂*NCO), δ 1.32 (4H, br, Biotin COCH₂CH₂*CH₂CH₂*), δ 1.17-1.16 (2H, br, Biotin COCH₂CH₂*CH₂CH₂*)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 1217.5 [(M8+2H)²⁺], 1135.0 [(M7+2H)²⁺]であった。なお、M7: グルコースを7分子有するリガンドの分子量、M8: グルコースを8分子有するリガンドの分子量である。

次に、ビオチンリンカー10にマルトースを集合化させリガンドを得た。

実施例1で得られたビオチンリンカー10を用いて、前記一般式(14)にて表される構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

上記一般式(14)にて示すように、マルトースの当量(始め9当量さらに9当量用)を用いた以外は、上記実施例2と同様に操作を行い、本発明のリガンドとして化合物11を得た。

得られた化合物11中のマルトースの集合化度は、その混合物のNMRを測定し、マルトース非還元末端1位プロトンとリンカー内の芳香族プロトン(16Hを基準)との強度比から計算した。両者の強度比は5.3:16となり、マルトースが平均して5.3分子集合していると思われた。マルトースがn分子集合した化合物の分子量(Mw)はビオチンリンカー10の分子量1120.4とマルトースが1分子集合する際の分子量増加326.3とを用いて、下記の式①のように表される。

$$Mw = 1120.4 + 326.3n \quad (\text{式①})$$

上記式①にn=5.3を代入し、分子量2849.8を得て、これを基に上記化合物11の収率を計算すると、88%と求められた。この化

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

49

化合物 11 を以下 5. 3-M a l と略称する。

化合物 11 を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、ビオチンリンカー 10 (3.2 mg, 2.9 μ mol) と、マルトース (9.4 mg, 26 μ mol) とを混合溶媒 (水/酢酸/メタノール = 6/1/15, 0.2 mL) に溶解させて室温で 8 時間攪拌後、さらにマルトース (9.3 mg, 26 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌し、ビオチンリンカー 10 / マルトース反応溶液を得た。このビオチンリンカー 10 / マルトース反応溶液に水素化シアノホウ素ナトリウム (約 5 mg, 80 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌後、再び水素化シアノホウ素ナトリウム (約 5 mg, 80 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌し還元した。この還元したビオチンリンカー 10 / マルトース反応溶液を減圧濃縮し、残渣を HP-20 (70 mL) を用いて精製し、水/メタノール = 1/1 で溶出させた画分を集めて濃縮し、残渣を凍結乾燥させて、化合物 11 として白色結晶を得た。

得られた化合物 11 は、収量 7.81 mg (収率 89%, 5.3 置換体として換算) であった。また、得られた化合物 11 の ^1H NMR (500 MHz, D_2O) 測定を行ったところ、 δ 7.31-6.51 (16H, br, aromatic H), δ 5.05 (1H \times 5.3, br, H-1), δ 4.56-4.44 (1H, br, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.25-4.20 (1H, br, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 3.92-3.91 (1H \times 5.3, br, H-2'), δ 3.84-3.82 (1H \times 5.3 \times 3, br, H-5, H-5', H-6b), δ 3.78 (1H \times 5.3 \times 2, dd, $J_{\text{gem}} = 13.7$, $J_{\text{vic}} = 4.5$ Hz, H-6a, H-6' b), δ 3.72-3.69 (1H \times 5.3 \times 3, br, $J_{3/4} = 8.2$ Hz, H-6' a, H-3', H-3), δ 3.67-3.62 (1H \times 5.3, br, H-4'), δ 3.53 (1H \times 5.3, d, $J_{2/1} = 10.0$ Hz, H-2), δ 3.41 (1H \times 5.3, t, $J_{4/3} = 9.5$ Hz, H-4), δ 3.37-3.36 (4H, br, Link C $\text{H}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 3.33-3.30 (4H, br, Link $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$),

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

50

δ 3.27-3.24 (1H \times 5.3, br, H-1' b), δ 3.17-3.05 (1H \times 5.3 + 1H, m, $J_{gem} = 13.1$, $J_{vic} = 6.2$ Hz, H-1' a, Biotin NHCHCH*S), δ 2.88-2.84 (9H, br, CH₂ \times 4 + 1H, Link NCH₂*CH₂NHCOPh, Biotin NHCHCH₂*S), δ 2.77-2.70 (1H, br, Biotin NHCHCH₂*S), δ 2.60-2.65 (4H, br, Link NHCOCH₂*CH₂NCO), δ 2.56 (8H, br, CH₂ \times 4, Link NCH₂CH₂*CONHPh), δ 2.20 (2H, t, $J_{B12/B11} = 5.0$ Hz, Biotin COCH₂*CH₂CH₂CH₂) δ 2.18-2.13 (4H, br, Link CH₂CH₂*NCH₂CH₂NHCOPh), δ 1.59-1.55 (2H, br, Biotin COCH₂*CH₂CH₂CH₂), δ 1.54-1.43 (2H, br, Biotin COCH₂CH₂CH₂CH₂*), δ 1.28-1.27 (2H, br, Biotin COCH₂CH₂CH₂*CH₂)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 1702.2 [(M8+2H)²⁺], 1540.3 [(M7+2H)²⁺], 1376.9 [(M6+2H)²⁺]であった。なお、M6: マルトースを6分子有するリガンドの分子量、M7: マルトースを7分子有するリガンドの分子量、M8: マルトースを8分子有するリガンドの分子量である。

(4-2 糖分子が4単位のリガンドの合成)

上記では集合させる糖をビオチンリンカー10に対して大過剰に加えたために、必要以上の糖が集合した不均一な集合体を得られた。そこで目的とする糖分子が4単位(分子)のリガンドを得るために、加える糖分子の当量を調製した。ここでは、集合化させる糖分子として、グルコース、マルトース、ラクトースの3種類を選択した。

初めに、実施例1にて得られたビオチンリンカー10を用いて、前記一般式(16)にてYがOで表される構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

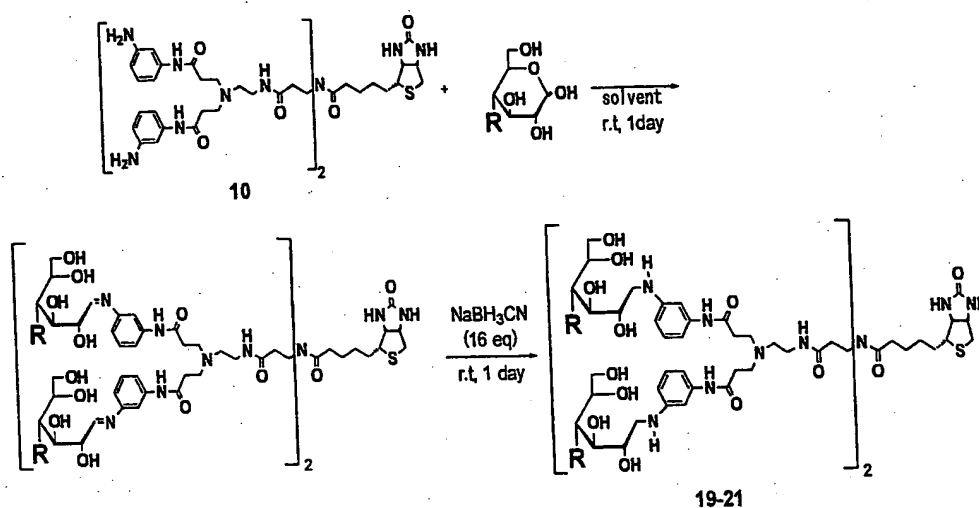
下記一般式(20)に示すように、グルコースをビオチンリンカー10に対してまず6当量加え、グルコースを順次加え合計で12当量加え

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

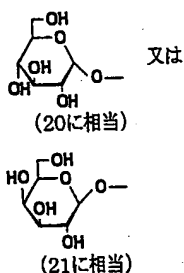
51

たとき、未反応のリンカーがまだ残存しても還元剤を加えた以外は、上記実施例4の(4-1)と同様に操作を行い、本発明のリガンドとして化合物19を得た。



R = HO- 又は
(19に相当)

....(20)



終夜還元したビオチンリンカー10/グルコース反応溶液を、HP-20を用いて同様に精製して得られた生成物は、ESI-MS測定の結果、グルコースが4または5分子集合した化合物の混合物であることが確認された。グルコースの集合化度はこの生成物のNMRを測定し、グルコース還元体であるグルシトールの1位プロトンとリンカー内の芳香

52

族プロトン（16Hを基準）の強度比から計算した。両者の強度比は4.2 : 16となり、グルコースが平均して4.2分子集合しているの見積もった。グルコースがn分子集合した化合物の分子量（Mw）はビオチンリンカーの分子量1120.4とグルコースが1分子集合した際の分子量増加164.1を用いて式②のように表される。

$$Mw = 1120.4 + 164.1n \quad (\text{式②})$$

上記（式②）にn = 4.2を代入し分子量1809.2を得て、これを基に計算すると、化合物19の収率は24%と求められた。収率が低いのはHP-20を用いた精製の際に損失があったためである。このように当量を調整することでグルコースがほぼ4分子集合した化合物を合成することができた。以下、末端にグルシトール型の化合物を4.2分子持つ化合物19を4-Glcと略称する。

化合物19を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、ビオチンリンカー10（4.91 mg, 3.11 mmol）と、グルコース（3.45 mg, 19.2 mmol）とを混合溶媒（水/酢酸/メタノール = 12/1/15, 0.2 mL）に溶解させ、室温で8時間攪拌し、ビオチンリンカー10/グルコース反応溶液を得た。このビオチンリンカー10/グルコース反応溶液に、さらにグルコース（1.64 mg, 9.1 mmol）を加えて室温で終夜攪拌後、水素化シアノホウ素ナトリウム（4 mg, 48 mmol）を加えて室温で終夜攪拌し、還元した。還元したビオチンリンカー10/グルコース反応溶液を減圧濃縮し、残渣をHP-20（70 mL）を用いて精製し、メタノールで溶出させた画分を集めて濃縮し、残渣を凍結乾燥させて、化合物19として白色結晶を得た。

得られた化合物19は、収量2.77 mg（収率35%）であった。また、

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

53

得られた化合物 19 の ^1H NMR (500 MHz, D_2O) 測定を行ったところ、
 δ 7.05–7.02 (4H, m, aromatic H), δ 6.86–6.52 (12H, m, aromatic H),
 δ 4.44 (1H, dd, $J_{\text{B7/B6}} = 5.3$, $J_{\text{B7/B3}} = 7.5$ Hz, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$),
 δ 4.17 (1H, dd, $J_{\text{B3/B4}} = 4.5$, $J_{\text{B3/B7}} = 7.9$ Hz, Biotin NHCH^*CHS), δ
3.92 (4H, td, $J = 8.6$, 4.7 Hz, H-2), δ 3.80–3.73 (12H, m, H-3, 6
b, 5), δ 3.68–3.60 (8H, m, $1\text{H} \times 4 \times 2$, H-6a, 4), δ 3.30–3.25 (20H,
m, $1\text{H} \times 4 + \text{CH}_2 \times 2 \times 2$, H1a, Link $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, $\text{CONCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH}$
H), δ 3.07 (4H, $1\text{H} \times 4$, dd, $J_{\text{gem}} = 13.2$, $J_{\text{vic}} = 8.2$ Hz, H1b), δ 3.0
6–3.04 (1H, m, Biotin NHCHCH^*S), δ 2.86–2.83 (8H, $\text{CH}_2 \times 4$, br, Lin
k $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 2.63–2.61 (4H, m, $2\text{H} \times 2$, Link $\text{CONCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONH}$)
, δ 2.54–2.53 (8H, br, $\text{CH}_2 \times 4$, Link $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 2.21–2.06
(6H, br, $\text{CH}_2 \times 3$, Link $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, Biotin $\text{COCH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$),
 δ 1.55 (2H, br, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 1.43–1.42 (2H,
br, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{CH}_2$), δ 1.30–1.23 (2H, br, $\text{CH}_2 \times 1$,
Biotin $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^*$)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 9
11.4 $[(\text{M}+2\text{Na})^{2+}]$ であった。 $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +0.373$ (c 0.0295, H_2O) であつ
た。

次に、実施例 1 にて得られたビオチンリンカー 10 を用いて、前記一
般式 (17) にて Y が O で表される構造を備えているリガンドを以下の
手順にて合成した。

上記一般式 (20) に示すように、グルコースに変えてマルトースを
8 当量用いた以外は、上記実施例 4 の (4-1) と同様に操作を行い、
本発明のリガンドとして化合物 20 を得た。得られた化合物 20 は、そ
の NMR において末端グルコース 1 位プロトンと、芳香族プロトンの強

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

54

度比が4.1 : 1.6となり、平均してマルトースが4.1分子集合した化合物であると見積もられた。化合物20の収率は上記(式①)に集合化度4.1を代入して化合物19の場合と同様に計算すると、69%と求められた。以下、末端に α -グルコースを4.1分子持つ化合物20を4-Ma1と略称する。

化合物20を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、ビオチンリンカー10 (25.0 mg, 15.8 μ mol) と、マルトース (34.3 mg, 95.1 μ mol) とを混合溶媒 (水/酢酸/メタノール = 15/1/15, 0.55 mL) に溶解させて、室温で9時間攪拌し、ビオチンリンカー10/マルトース反応溶液を得た。ビオチンリンカー10/マルトース反応溶液に、さらにマルトース (10.7 mg, 29.7 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌後、水素化シアノホウ素ナトリウム (15 mg, 240 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌し、還元させた。還元させたビオチンリンカー10/マルトース反応溶液を減圧濃縮し、残渣をHP-20 (70 mL) を用いて精製し、水/メタノール = 1/1 及びメタノールで溶出された画分を集めて濃縮し、残渣を凍結乾燥させて、化合物20として白色結晶を得た。

得られた化合物20は、収量26.7 mg (収率70%) であった。また、得られた化合物20の ^1H NMR (500 MHz, D_2O) 測定を行ったところ、 δ 7.06-7.01 (4H, m, aromatic H), δ 6.78-6.77 (4H, m, aromatic H), δ 6.70-6.66 (4H, m, aromatic H), δ 6.51-6.50 (4H, m, aromatic H), δ 5.04 (4H, d, $1\text{H} \times 4$, $J_{vic} = 2.7$ Hz, H-1), δ 4.43 (1H, dd, $J_{B7/B6} = 8.0$, $J_{B7/B3} = 4.9$ Hz, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.19-4.17 (1H, br, Biotin NHCH^*CHS), δ 3.92-3.90 (8H, m, $\text{CH} \times 4 \times 2$, H-2', 5'), δ 3.

55

83-3.80 (8H, m, $\text{CH} \times 4 \times 2$, H-5, 6' a), δ 3.73 (8H, dd, $\text{CH} \times 4 \times 2$, $J_{3/2} = 5.2$, $J_{3'/2'} = 5.0$ Hz, H-3, 3'), δ 3.60 (4H, dd, $\text{CH} \times 4$, $J = 7.4$, 11.7 Hz, H-4'), δ 3.53 (4H, dd, $\text{CH} \times 4$, $J_{2/3} = 8.0$, $J_{2/1} = 3.7$ Hz, H-2), δ 3.41 (4H, t, $\text{CH} \times 4$, $J = 9.5$ Hz, H-4), δ 3.30-3.22 (12H, m, $1\text{H} \times 4 + \text{CH}_2 \times 2 \times 2$, H1' b, Link $\text{CH}_2^* \text{CH}_2 \text{NCH}_2 \text{CH}_2 \text{CONHPh}$, $\text{CONCH}_2^* \text{CH}_2 \text{CONH}$), δ 3.14 (4H, dd, $1\text{H} \times 4$, $J_{gem} = 12.9$, $J_{vic} = 8.0$ Hz, H1' a), δ 3.06 (1H, m, Biotin $\text{NHCHCH}^* \text{S}$), δ 2.84-2.83 (9H, br, $\text{CH} + \text{C}_\text{H}_2 \times 4$, Link $\text{NCH}_2^* \text{CH}_2 \text{CONHPh}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^* \text{S}$), δ 2.70-2.66 (5H, br, $\text{CH} + \text{CH}_2 \times 4$, Link $\text{CONCH}_2^* \text{CH}_2 \text{CONH}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^* \text{S}$), δ 2.62-2.60 (4H, br, $\text{CH}_2 \times 2$, Link $\text{CONCH}_2 \text{CH}_2^* \text{CONH}$), δ 2.53-2.52 (8H, br, $\text{CH}_2 \times 4$, Link $\text{NCH}_2 \text{CH}_2^* \text{CONHPh}$), δ 2.20-2.04 (6H, br, $\text{CH}_2 \times 3$, Link $\text{CH}_2 \text{CH}_2^* \text{NCH}_2 \text{CH}_2 \text{CONHPh}$, Biotin $\text{COCH}_2^* \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2$), δ 1.55 (2H, br, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2 \text{CH}_2^* \text{CH}_2 \text{CH}_2$), δ 1.43-1.42 (2H, br, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2^* \text{CH}_2$), δ 1.30-1.23 (2H, br, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2^*$)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 817.0 [$(\text{M}+3\text{H})^{3+}$]であった。 $[\alpha]_D^{22} = +5.11$ (c 0.243, H_2O)であった。Calcd for $\text{C}_{104}\text{H}_{165}\text{N}_{15}\text{O}_{48}\text{S} \cdot 11.9 \text{H}_2\text{O}$: C, 47.30; H, 7.16; N, 7.96%. Found: C, 47.30; H, 6.88; N, 7.86%。

次に、実施例1にて得られたビオチンリンカー10を用いて、前記一般式(18)にてYがOで表される構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

上記一般式(20)に示すように、グルコースに代えて、ラクトースを8当量用いた以外は、上記(4-1)と同様に操作を行い、本発明のリガンドとして化合物21を得た。得られた化合物21は、NMR測定において、ガラクトース1位プロトンと芳香族プロトン強度比は4.2

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

56

: 16 となり、ラクトースが平均 4.2 分子集合した化合物であると見積もられた。この場合も上記式①による分子量の計算が可能となり、集合化度 4.2 を代入し分子量 2477.8 を得て、これをもとにして計算すると収率は 57% と求められた。以下、末端に β -ガラクトースを 4.2 分子持つ化合物 21 を 4-Lac と略称する。

化合物 21 を得るために、具体的に次のような操作を行った。ビオチンリンカー 10 (7.88 mg, 5.0 μ mol)、ラクトース (10.6 mg, 29.4 μ mol) を混合溶媒 (水/酢酸/メタノール = 20/1/15, 0.4 mL) に溶解させて、室温で 10 時間攪拌し、ビオチンリンカー 10 / ラクトース反応溶液を得た。このビオチンリンカー 10 / ラクトース反応溶液に、さらにラクトース (3.59 mg, 10.0 μ mol) を加え室温で終夜攪拌後、水素化シアノホウ素ナトリウム (5 mg, 80 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌し還元した。還元したビオチンリンカー 10 / ラクトース反応溶液を減圧濃縮し、残渣を HP-20 (70 mL) を用いて精製し、水/メタノール = 1/1 及びメタノールで溶出させた画分を集めて濃縮し、残渣を凍結乾燥させて、化合物 21 として白色結晶を得た。

得られた化合物 21 は、収量 7.08 mg (収率 59%) であった。得られた化合物 21 の ^1H NMR (600 MHz, D_2O) 測定を行ったところ、 δ 6.99 (4H, d, $J = 8.3$ Hz, aromatic H), δ 6.72 (4H, d, $J = 6.9$ Hz, aromatic H), δ 6.65 (4H, d, $J = 8.3$ Hz, aromatic H), δ 6.47 (4H, t, $J = 6.2$ Hz, aromatic H), δ 4.38 (4H, d, $1\text{H} \times 4$, $J_{\text{vic}} = 7.7$ Hz, H-1), δ 4.35 (1H, m, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 4.09 (1H, dd, $J_{\text{B3/B4}} = 4.4$, $J_{\text{B3/B7}} = 7.9$ Hz, Biotin NHCH^*CHS), δ 3.97-3.94 (4H, m, $\text{CH} \times 4$, H-2'), δ 3.84-3.81 (8H, m, $\text{CH} \times 4 \times 2$, H-5, 5'), δ 3.79 (8H, d, $\text{CH} \times 4$

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

57

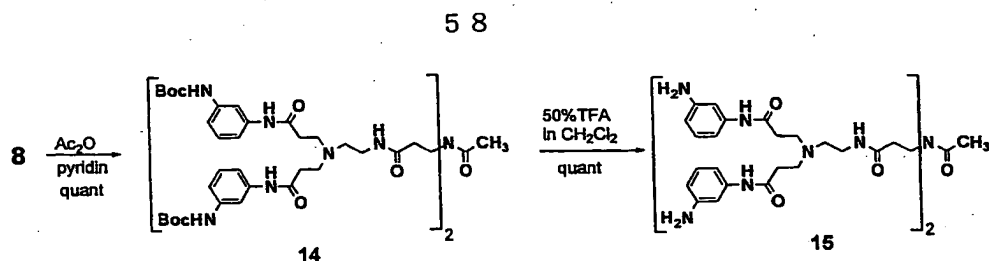
$\times 2$, $J_{4/3} = 3.0$ Hz, H-4, 6a), δ 3.75-3.73 (12H, m, $\text{CH} \times 4 \times 3$, H-3', 6' a, 6b), δ 3.63 (4H, dd, $\text{CH} \times 4$, $J_{4/3} = 6.1$ Hz, H-4', 6' b), δ 3.57-3.56 (4H, m, $\text{CH}_2 \times 4$, Link $\text{CH}_2^* \text{CH}_2 \text{NCH}_2 \text{CH}_2 \text{CONHPh}$), δ 3.52 (4H, dd, $J_{3/2} = 10.0$, $J_{3/4} = 3.5$ Hz, H-3), δ 3.49 (4H, t, $\text{CH}_2 \times 2$, $J = 6.3$ Hz, Link $\text{CH}_2 \text{CH}_2^* \text{NCH}_2 \text{CH}_2 \text{CONHPh}$), δ 3.46 (4H, dd, $J_{2/1} = 7.7$, $J_{2/3} = 10.0$ Hz, H-2), δ 3.29-3.19 (12H, br, $\text{CH} \times 4 + \text{CH}_2 \times 4$, Link N $\text{CH}_2^* \text{CH}_2 \text{CONHPh}$, H-1' b), δ 3.02-2.98 (5H, m, Biotin $\text{NHCHCH}^* \text{S}$, H-1' a), δ 2.81-2.75 (9H, br, $\text{CH} + \text{CH}_2 \times 4$, Link $\text{NCH}_2^* \text{CH}_2 \text{CONHPh}$, Biotin $\text{NHCHCH}_2^* \text{S}$), δ 2.59 (1H, d, $J_{gem} = 13.2$ Hz, Biotin $\text{NHCHCH}_2^* \text{S}$), δ 2.48 (8H, br, Link $\text{NCH}_2 \text{CH}_2^* \text{CONHPh}$), δ 2.13-2.03 (6H, br, Link $\text{CONC H}_2 \text{CH}_2^* \text{CONH}$, Biotin $\text{COCH}_2^* \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2$), δ 1.47 (2H, br, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2 \text{CH}_2^* \text{CH}_2 \text{CH}_2$), δ 1.35 (2H, br, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2^* \text{CH}_2$), δ 1.18 (2H, br, $\text{CH}_2 \times 1$, Biotin $\text{COCH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2^* \text{CH}_2$)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 831.3 [$(M+3Na)^{3+}$]であった。 $[\alpha]_D^{22} = -11.3$ (c 0.292, H_2O)であった。Calcd for $\text{C}_{104}\text{H}_{165}\text{N}_{15}\text{O}_{48}\text{S} \cdot 10.4 \text{ H}_2\text{O}$: C, 47.78; H7.12; N, 8.04%. Found: C, 47.78; H, 6.95; N, 8.00%.

〔比較例1・アセチルリンカーを用いたリガンド〕

本実施例では対照化合物として、ビオチンのかわりにアセチル基を導入したリンカー化合物を合成した。すなわち、下記一般式(21)に示すように、ビオチンを導入する前の2級アミンである化合物8に、ピリジン中無水酢酸を反応させてアセチル化し、化合物14を得た。その後、化合物14の末端のBoc基を先と同じ条件で脱保護してリンカー化合物15を定量的に得た。以下このリンカー化合物15をアセチルリンカー15と略称する。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973



....(21)

化合物 14 を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、化合物 8 (13.1 mg, 54.5 μ mol) をピリジン (0.5 mL) に溶解させ、これに無水酢酸 (0.5 mL, 5.3 mmol) を加えて室温で 4 時間撹拌した。反応溶液を減圧濃縮し、トルエンで 2 回共沸し、残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィ (5 g, クロロホルム : メタノール = 10 : 1 ~ 5 : 1) で精製して、化合物 14 として黄色結晶を得た。

得られた化合物 14 は、収量 12.8 mg (収率 95%) であった。また、得られた化合物 14 の ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 測定を行ったところ、 δ 7.60 (4H, s, aromatic H), 7.09–6.97 (12H, m, aromatic H), δ 3.32 (4H, t, $J = 6.6$ Hz, $\text{AceNCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH}$), δ 3.19–3.17 (4H, br, $\text{AceNC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2^*$), δ 2.77 (8H, t, $J = 6.1$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 2.52 (4H, t, $J = 6.4$ Hz, $\text{AceNCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2^*$), δ 2.42 (8H, d, $J = 6.1$ Hz, $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 2.12 (4H, t, $J = 6.6$ Hz, $\text{AceNCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONH}$), δ 1.90 (s, 3H, Me of Ace), δ 1.40 (s, 36H, Me of Boc) であった。また、ESI-MS (positive) m/z 668.9 [$(\text{M}+2\text{H})^{2+}$] であった。

また、アセチルリンカー 15 を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、化合物 14 (12.8 mg, 9.6 μ mol) をジクロロメタン (0.5 mL) に溶解させ、トリフルオロ酢酸 (0.5 mL) を加えて 0 $^\circ\text{C}$ で 1 時間撹拌し、化合物 14 / トリフルオロ酢酸反応溶液を得た。この

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

59

化合物 14 / トリフルオロ酢酸反応溶液を減圧濃縮し、残渣を L H 2 O (140 mL, メタノール溶出) を用いて精製して、アセチルリンカー 15 として黄色結晶を得た。

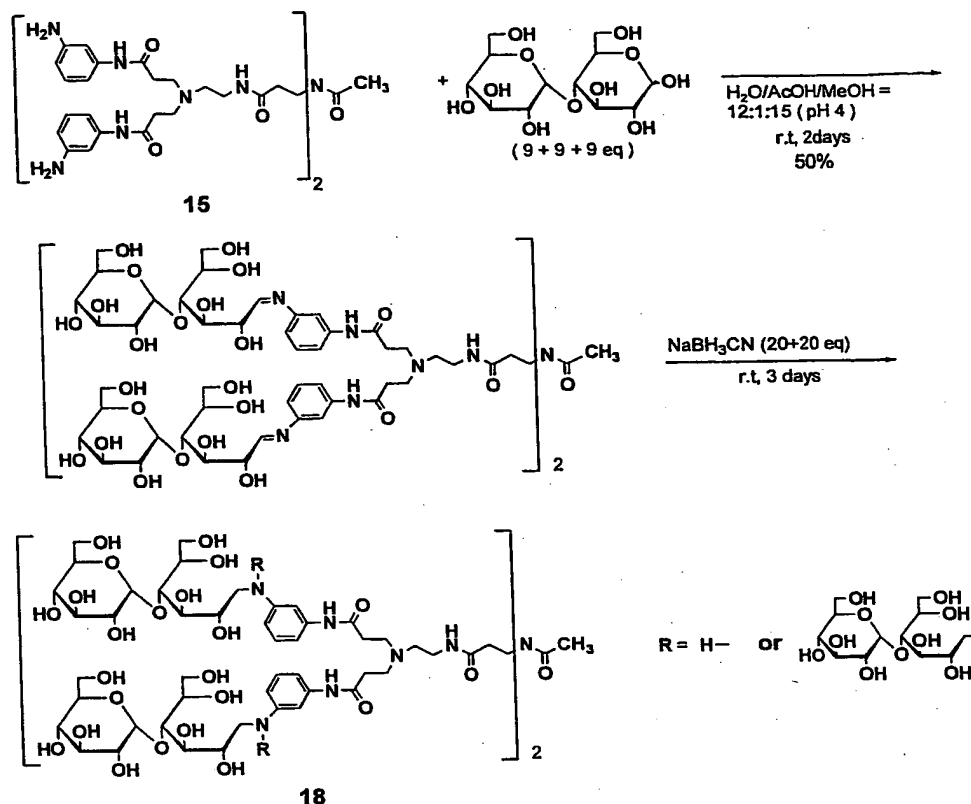
得られたアセチルリンカー 15 は、収量 14.9 mg (100%) であった。また、得られたアセチルリンカー 15 の ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 測定を行ったところ、 δ 7.50 (4H, s, aromatic H), δ 7.27-7.19 (8H, m, aromatic H), δ 6.86-6.81 (4H, m, aromatic H), δ 3.57-3.51 (12H, br, $\text{AceNCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2^*$, $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 3.40 (4H, dd, $J = 6.4$ Hz, $\text{AceNCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONH}$), δ 3.35-3.32 (4H, br, $J_{5/4} = 5.1$ Hz, $\text{AceNCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2^*$), δ 2.91 (4H, t, $J_{7/6} = 6.1$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 1.88 (s, 3H, Me of Ace) であった。ESI-MS (positive) m/z 647.8 [$(M+2H)^2$] であった。

上記のように得られたアセチルリンカー 15 を用いて、マルトースを集合化させリガンドを得た。下記一般式 (22) に示すように、ビオチンリンカー 10 にグルコースを反応させたのに代えて、アセチルリンカー 15 に対して合計で 2.7 当量のマルトースを反応させた以外は、上記実施例 4 の (4-1) と同様に操作を行い、化合物 18 を得た。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

60



....(22)

得られた化合物 18 は、その NMR においてマルトース非還元末端 1 位プロトンとリンカー由来の芳香族プロトンの強度比が 7.9 : 16 となり、平均してマルトースが 7.9 分子集合した化合物であると見積もった。マルトースが n 分子集合した化合物の分子量 (Mw) は、アセチルリンカー 15 の分子量 936.1 とマルトースが 1 分子集合する際の分子量増加 326.3 を用いて、式③のように表される。

$$\text{Mw} = 936.1 + 326.3n \quad (\text{式③})$$

上記 (式③) に $n = 7.9$ を代入し、分子量 3562.8 を得て、これを基に化合物 18 収率を計算すると 50% と求められた。以下この化

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

61

化合物 18 を A c e - 8 - M a l と略称する。

化合物 18 を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、アセチルリンカー 15 (3.73 mg, 7.3 μ mol) と、マルトース (11.5 mg, 33.6 μ mol) とを混合溶媒 (水/酢酸/メタノール = 6/1/15, 0.25 mL) に溶解させて室温で終夜攪拌後、さらにマルトース (13.0 mg, 38.0 μ mol) を加えて室温で攪拌し、7時間後に再びマルトース (14.7 mg, 42.9 μ mol) を加えてから、水素化シアノホウ素ナトリウム (20 mg, 320 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌し、反応溶液を得た。この反応溶液に、水素化シアノホウ素ナトリウム (20 mg, 320 μ mol) を再び加えて室温で終夜攪拌した。この再び水素化シアノホウ素ナトリウムを加えた反応溶液を減圧濃縮し、残渣を H P - 20 (70 mL) を用いて精製し、水/メタノール = 1/1 で溶出させた画分を集め濃縮し、残渣を凍結乾燥させて、化合物 18 として白色結晶を得た。

得られた化合物 18 は、収量 7.02 mg (50%, 8置換体として換算) であった。また、得られた化合物 18 の ^1H NMR (500 MHz, D_2O) 測定を行ったところ、 δ 7.09-7.04 (4H, br, $J = 7.6$ Hz, aromatic H), δ 6.93-6.91 (4H, br, aromatic H), δ 6.65-6.58 (8H, br, aromatic H), δ 5.05 (1H \times 8, d, $J_{1/2} = 2.3$ Hz, H-1), δ 3.88 (1H \times 8 \times 2, br, H-2', 5'), δ 3.83 (1H \times 8, br, H-5), δ 3.82 (1H \times 8, br, H-6b), δ 3.74 (1H \times 8 \times 2, dd, $J_{\text{gem}} = 12.4$, $J_{\text{vic}} = 5.5$ Hz, H-6' b, H-6a), δ 3.69 (1H \times 8, br, $J_{3/4} = 9.4$ Hz, H-3), δ 3.67-3.64 (1H \times 8 \times 2, br, H-3', 6' a), δ 3.59-3.57 (1H \times 8, br, H-4'), δ 3.53 (1H \times 8, dd, $J_{2/1} = 9.9$, $J_{2/3} = 3.5$ Hz, H-2), δ 3.41 (1H \times 8, t, $J_{4/3} = 9.6$ Hz, H-4), δ 3.30 (8H, br, Link $\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^*\text{NCO}$), δ 3.2

WO 2004/022565

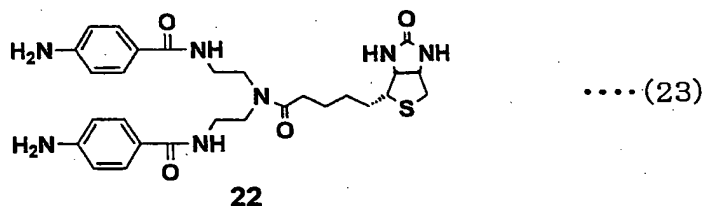
PCT/JP2003/009973

62

4 (1H×8, br, H-1' b), δ 3.15 (1H×8, br, H-1' a), δ 2.87-2.82 (8H, br, Link $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 2.66 (4H, br, $J = 8.0$ Hz, Link $\text{CH}_2\text{CH}_2^*\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHPh}$), δ 2.57 (8H, br, Link $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{CONHPh}$), δ 2.10-2.08 (4H, br, $J = 7.1$ Hz, Link $\text{NHCOCH}_2^*\text{CH}_2\text{NCO}$), δ 1.88 (3H, s, Me of Ace)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 1190.4 [(M8+2Na+H)³⁺], 1081.1 [(M7+2H+Na)³⁺]であった。なお、M7: マルトースを7分子有するリガンドの分子量、M8: マルトースを8分子有するリガンドの分子量である。

[比較例2・芳香族アミノ基を2残基有するビオチンリンカーを用いたリガンド]

比較対照のために、下記一般式(23)に示すように特許文献2に記載の末端に芳香族アミノ基を2残基もつリンカー化合物22 (divalent type、ビオチンリンカー22と呼ぶ)を用い、糖分子を2単位(分子)集合させ、リガンドを合成した。



上記実施例4の(4-2)で得た糖分子4単位を集合させたリガンドの場合と同様にして、ビオチンリンカー22を用いて糖分子を2単位集合させたリガンドを合成した。なお、2単位集合させる糖にはグルコースとマルトースを選択した。

初めに、ビオチンリンカー22にグルコースを集合させ、リガンドである化合物23を得た。下記一般式(24)に示すように、ビオチンリ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

63

ンカー 10 に対してグルコースを反応させるのに代え、ビオチンリンカー 22 に対して 4 当量のグルコースを反応させた以外は、上記実施例 4 の (4-1) と同様に操作を行い、化合物 23 を得た。化合物 23 の集合化度は、化合物 23 の NMR 測定においてグルコース還元体であるグルシトール 1 位プロトンとビオチンリンカー 22 内の芳香族プロトン (8H を基準) の強度比から計算した。両者の強度比は 2.1 : 8 となり、化合物 23 にはグルコースが平均して 2.1 分子集合していると見積もった。グルコースが n 分子集合した化合物の分子量 (M_w) はビオチンリンカー 22 の分子量 567.7 とグルコースが 1 分子集合する際の分子増加 164.1 を用いて式④のように表される。

$$M_w = 567.7 + 164.1n \quad (\text{式④})$$

上記 (式④) に $n = 2.1$ を代入し、分子量 912.3 を得て、これを基に化合物 23 の収率を計算すると 73% と求められた。以下、化合物 23 を 2-G1c と略称する。

次に、ビオチンリンカー 22 にマルトースを集合させ、リガンドである化合物 24 を得た。下記一般式 (24) に示すように、グルコースに代えマルトースを用いた以外は、上記化合物 23 を得た操作と同様にマルトースを集合化させ、化合物 23 を得た。化合物 24 の NMR 測定において、末端グルコース 1 位プロトンとビオチンリンカー 22 内の芳香族プロトン (8H を基準) の強度比は 2.0 : 8 となり、化合物 24 には、マルトースが平均して 2.0 分子集合していると見積もられた。マルトースが n 分子集合した化合物の分子量 (M_w) は、ビオチンリンカー 22 の分子量 567.7 とマルトースが 1 分子集合する際の分子量増加 326.3 を用いて式⑤のように表される。

WO 2004/022565

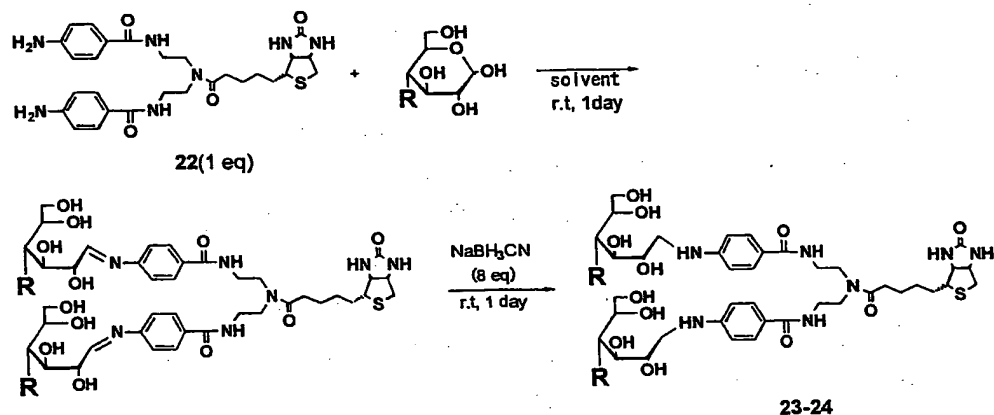
PCT/JP2003/009973

64

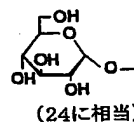
$$M_w = 567.7 + 326.3n \quad (\text{式⑤})$$

上記(式⑤)に $n = 2.0$ を代入して、分子量 1207.2 を得て、これを基に化合物 24 の収率を計算したところ、76%と求められた。

以下、化合物 24 を 2-Ma1 と略称する。



R = HO- 又は
(23に相当)



.... (24)

化合物 23 を得るために、具体的に次のような操作を行った。すなわち、ビオチンリンカー 22 (4.14 mg, 7.3 μmol) と、グルコース (3.84 mg, 21.3 μmol) とを混合溶媒 (水/酢酸/メタノール = 6/1/15, 0.25 mL) に溶解させて、室温で 6 時間攪拌し、ビオチンリンカー 22 / グルコース反応溶液を得た。このビオチンリンカー 22 / グルコース反応溶液に、さらにグルコース (1.38 mg, 7.66 μmol) を加えて室温で終夜攪拌後、水素化シアノホウ素ナトリウム (6 mg, 96 μmol) を加えて室温で終夜攪拌し還元した。この還元したビオチンリンカー 22 / グ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

65

ルコース反応溶液を減圧濃縮し、残渣をHP-20 (70 mL) を用いて精製し、水/メタノール=1/1で溶出させた画分を集めて濃縮し、残渣を凍結乾燥させて、化合物23として白色結晶を得た。

得られた化合物23は、収量4.84 mg (収率74%) であった。得られた化合物23の¹H NMR (600MHz, D₂O) 測定を行ったところ、 δ 7.51 (4H, d, J = 6.6 Hz, aromatic H), δ 6.62 (4H, d, J = 9.1 Hz, aromatic H), δ 4.33 (1H, dd, $J_{B7/B4}$ = 3.0, $J_{B7/B6}$ = 5.0 Hz, Biotin NHCH*CH₂S), δ 3.88 (2H, dd, $J_{2/1}$ = 4.4, $J_{2/3}$ = 4.9 Hz, H-2), δ 3.84 (1H, dd, $J_{B3/B4}$ = 4.4, $J_{B3/B7}$ = 3.7 Hz, Biotin NHCH*CHS), δ 3.75 (2H, dd, $J_{3/2}$ = 4.9, $J_{3/4}$ = 3.2 Hz, H-3), δ 3.74-3.72 (2H, m, H-6b), δ 3.72-3.69 (4H, br, CH₂×2, Link NCH₂CH₂*NHCOPh), δ 3.69-3.67 (2H, m, H-5), δ 3.64 (4H, t, CH₂×2, J = 4.6 Hz, Link NCH₂*CH₂NHCOPh), δ 3.60 (2H, dt, $J_{4/3}$ = 2.5, $J_{4/5}$ = 7.7 Hz, H-4), δ 3.53 (2H, dd, J = 2.2, 6.0 Hz, H-6a), δ 3.33-3.29 (2H, dt, J_{gem} = 13.7, J_{vic} = 4.7 Hz, H-1a), δ 3.11 (2H, dt, J_{gem} = 11.2, J_{vic} = 3.3 Hz, H-1b), δ 2.72 (1H, dd, J_{gem} = 12.9, J_{vic} = 5.0 Hz, Biotin NHCHCH₂*S), δ 2.57 (1H, d, J_{gem} = 13.2 Hz, Biotin NHCHCH₂*S), δ 2.55-2.53 (1H, m, J = 3.3 Hz, Biotin NHCHCH*S), δ 2.14 (2H, t, $J_{B12/B11}$ = 7.0 Hz, Biotin COCH₂*CH₂CH₂CH₂), δ 1.22-1.10 (4H, m, CH₂×2, Biotin COCH₂CH₂*CH₂CH₂*)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 470.7 [(M+2Na)²⁺] であった。 $[\alpha]_D^{22}$ = +6.61 (c 0.145, H₂O) であった。Calcd for C₄₀H₆₁N₇O₁₄S · 6.5 H₂O: C, 47.45; H, 7.31; N, 9.69%. Found: C, 47.44; H, 6.580; N, 9.60%。

また、化合物24を得るために、具体的に次のような操作を行った。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

66

すなわち、ビオチンリンカー 22 (4.12 mg, 7.3 μ ol) とマルトース (7.9 mg, 22.1 μ mol) とを混合溶媒 (水/酢酸/メタノール = 12/1/15, 0.25 mL) に溶解させて室温で終夜攪拌しビオチンリンカー 22 / マルトース反応溶液を得、その後水素化ホウ素シアノナトリウム (6 mg, 96 μ mol) を加えて室温で終夜攪拌し還元した。この還元したビオチンリンカー 22 / マルトース反応溶液を減圧濃縮し、残渣を H P - 20 (70 mL) を用いて精製し、水/メタノール = 1 / 1 で溶出させた画分を集めて濃縮し、残渣を凍結乾燥させて、化合物 24 として白色結晶を得た。

得られた化合物 24 は、収量 6.71 mg (収率 75%) であった。また、得られた化合物 24 の ^1H NMR (500 MHz, D_2O) 測定を行ったところ、 δ 7.60 (4H, d, $J = 4.5$ Hz, aromatic H), δ 6.74 (4H, d, $J = 8.8$ Hz, aromatic H), δ 5.09 (2H, d, $J_{1/2} = 3.7$ Hz, H-1), δ 4.44 (1H, dd, $J_{B7/B6} = 4.8$, $J_{B7/3} = 3.1$ Hz, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$), δ 3.95-3.93 (2H, br, H-2'), δ 3.91-3.90 (2H, br, H-5'), δ 3.90-3.89 (2H + 1H, br, Biotin $\text{NHCH}^*\text{CH}_2\text{S}$, H-3'), δ 3.87-3.86 (2H, br, H-5), δ 3.82 (2H, d, $J_{\text{gem}} = 12.7$ Hz, H-6a), δ 3.76 (2H, dd, $J_{\text{gem}} = 12.5$, $J_{\text{vic}} = 5.2$ Hz, H-6b), δ 3.72 (4H, m, $1\text{H} \times 2 \times 2$, $J_{\text{gem}} = 12.1$, $J_{3/4} = 9.3$ Hz, H-6' a, H-3), δ 3.66 (4H, br, $\text{CH}_2 \times 2$, Link $\text{NCH}_2\text{CH}_2^*\text{NHCOPh}$), δ 3.62 (4H, d, $J_{\text{gem}} = 11.8$ Hz, H-6' b, H-4'), δ 3.58-3.54 (6H, m, $\text{CH}_2 \times 2 + 1\text{H} \times 2$, Link $\text{NCH}_2^*\text{CH}_2\text{NHCOPh}$, H-2), δ 3.42 (2H, t, $J_{4/3} = 9.6$ Hz, H-4), δ 3.37 (2H, dt, $J_{\text{gem}} = 13.7$, $J_{\text{vic}} = 4.8$ Hz, H-1' b), δ 3.29 (2H, td, $J_{\text{gem}} = 7.4$, $J_{\text{vic}} = 3.0$ Hz, H-1' a), δ 2.83 (2H, dd, $J_{\text{gem}} = 13.0$, $J_{\text{vic}} = 5.1$ Hz, Biotin $\text{NHCHCH}_2^*\text{S}$), δ 2.67 (2H, d, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz

67

, Biotin NHCHCH₂*S), δ 2.65-2.62 (2H, m, Biotin NHCHCH₂*S), δ 2.24 (2H, t, $J_{B12/B11} = 7.0$ Hz, Biotin COCH₂*CH₂CH₂CH₂), δ 1.31-1.19 (4H, m, CH₂×2, $J_{B11/B12} = 7.0$, $J_{B9/B10} = 7.4$ Hz, Biotin COCH₂CH₂*CH₂CH₂*), δ 0.95-0.91 (2H, m, Biotin COCH₂CH₂CH₂*CH₂)であった。また、ESI-MS (positive) m/z 632.8 [(M+2Na)²⁺] であった。 $[a]_D^{22} = +6.95$ (c 0.222, H₂O) であった。Calcd for C₅₂H₈₁N₇O₂₄S · 9.1 H₂O: C, 45.13; H, 7.17; N, 7.09%. Found: C, 45.13; H, 6.63; N, 7.37%。

以上のように、糖分子を4単位あるいは2単位集合させたリガンドを合成した。以下これらのリガンドを用いてタンパク質との相互作用をSPR測定により解析した。

〔実施例5・SPR法を用いた糖分子とタンパク質との特異的相互作用〕

SPR測定ではアナライトがリガンド以外の分子と非特異的に相互作用する場合が多い。そのため実際の測定では、特異的な相互作用と非特異的なものが合わさった共鳴角度変化を観測している。非特異的な相互作用を低減し、特異的な相互作用を観測するということが測定上の最大の問題点となる。本発明者らは、この問題点を次の方法(2チャンネル解析法と称する)により解決できるのではないかと考えた。

本実施の形態で用いるSTR測定を行う装置SPR670(商品名、Nippon Laser & Electronics LAB)には、(S), (R)という2つのチャンネルがあり、図3に示すように、それぞれの表面上のリガンドとアナライトとの相互作用を同時に観測できる。例えば、一方の表面は4-Ma1を、他方には4-Glcを固定化し、グルコースに結合するレクチンであるコンカナバリンA(Concanavalin A, Con A)をこれら2

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

68

つの表面に同時に同条件で流すとする。Con Aは4-M a lの末端に存在するグルコピラノースと結合するが、これを持たない4-G l cとは結合しにくいと考えられる。4-M a lと4-G l cとは、末端に存在する糖の有無以外は同じ構造なので、Con Aとの相互作用に差があると思えば、4-M a lに存在するグルコピラノースに起因すると思えられる。すなわち観測される(S)，(R)の共鳴角度変化の差がグルコピラノースとCon Aとの特異的な相互作用に相当する。

このように2種類の異なるリガンドを(S)と(R)とにそれぞれ固定化し、両者の相互作用の差を観測するという従来の手法を応用し、末端の糖の有無以外は同じ構造を持つ化合物をリガンドとして用いることによって、糖分子とタンパク質との特異的な相互作用が検出できることを本発明者らは見いだした。

(5-1 リガンド導入チップの作製)

初めに、SPR測定により糖分子とタンパク質との相互作用解析を行うために、センサチップにリガンドを固定化した。すなわち、実施例4で合成したリガンドをビオチン-アビジンの結合を利用してチップ上に固定化させ、リガンド導入チップ(リガンド担持体)を得た。なお、アビジンをSPRセンサチップ上に固定化させてから、リガンドを固定化した。

具体的にリガンド導入チップを得るために、以下のような操作を行った。すなわち、初めに、 $13 \times 20 \times 0.7$ mmのガラス基盤に50 nmの金薄膜を蒸着した日本レーザー電子株式会社製のセンサチップを、UVオゾンクリーナー(商品名: NL-UV253、日本レーザー電子株式会社)に入れて紫外線を20分間照射し、オゾンでセンサチップの表面を

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

69

洗浄した。次に、このセンサチップを100 μ Mの4,4'-ジチオ酪酸エタノール溶液の入ったシャーレに浸し、室温で30分間緩やかに振とうさせた（商品名：Bio Dancer、New Brunswick Scientific社）。チップに4-チオ酪酸を、金-硫黄結合を用いて固定させた。このチップをエタノールで3回洗浄したのち、160 mM水溶性カルボジイミド水溶液1 mLと13 mMのN-ヒドロキシスクシンイミド 1,4-Dioxan溶液9 mLとの混合溶液の入ったシャーレに浸し、室温で30分間緩やかに振とうさせた。シャーレに水10 mLを加え室温で5分間振とうさせて、活性化反応を終了させた。チップを水で4回洗浄し風乾後、SPR 670のセンサチップカートリッジに取り付けた。センサチップカートリッジに取り付けたチップにランニングバッファーを流し、レーザー光を金膜に照射させ、そのとき観測される表面プラズモン共鳴角度変化をモニターした。なお、ランニングバッファーは、pH 7.4のリン酸緩衝溶液（PBS）を用い、サンプルを流すとき以外は、常にランニングバッファーを流速5 mL/minでチップ上に流した。またSPR測定はすべて一定温度（25℃）で行い、測定で用いるサンプル溶液は全て、シリンジフィルター（Whatman(copyright) PURADISC（登録商標） 25TF 0.2 mm PTFE Membrane filter）を用いてろ過してから使用した。

上記チップにランニングバッファーを流し、共鳴角度変化が一定になってから、0.1 mg/mL ニュートロアビジン（PIERCE, NeutrAvidin（登録商標）, CA47105）酢酸ナトリウム水溶液（10 mM, pH 5.5）を、流速5 μ L/minで60 μ Lずつ3回流した。SPRでサンプル溶液を流した後はランニングバッファーに切り替え、余分なサンプルを洗い流して、共鳴角度変化が一定になってから次の操作を行った。残存す

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

70

る活性エステルを不活性化（キャッピング）するために、1.0 M アミノエタノールを含む P B S 溶液（pH 8.5）を流速 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で $60 \mu\text{L}$ ずつ 2 回流し、アビジン付加チップ（アビジン付加体）を得た。

続いて、種々の濃度の実施例 4 で得たリガンドの P B S 溶液を、流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で $60 \mu\text{L}$ ずつ順に流し、上記アビジン付加チップ上にリガンドを固定化させ、リガンド導入チップ（リガンド担持体）を得た。なお、リガンドの固定化は S P R センサーグラムでレゾナンスユニットの上昇が認められなくなるまで繰り返した。

リガンドを固定化させるまでの S P R センサーグラムの一例を図 4 に示す。ここでは S チャンネル（以下（S）と略称する）には上記実施例 4 の（4-3）で得た 4-M a l、R チャンネル（以下（R）と略称する）には 4-G l c を固定化させた時のセンサーグラムを表示した。センサーグラムは、横軸は時間、縦軸は共鳴角度変化（Response（R U；Response Unit））を示している。

アナライトを添加する時以外は、チップ上にランニングバッファーとしてリン酸緩衝溶液（pH 7.4，以下 PBS と略称する）が流速 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で絶えず流れている。チップ上へのアナライトの添加が終了すると、自動的に P B S が流れて、結合に関与しなかった余分なアナライトを洗浄するようにした。0.1 m g / m L のニュートロアビジン酢酸ナトリウム溶液（10 m M 酢酸ナトリウム，pH 5.5）を流速 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で $60 \mu\text{L}$ 流すと、共鳴角度の増加が観測され、ニュートロアビジンが上記チップに固定化されたことが分かった。

その後チップ上に残存する活性エステルをキャッピングするため、1.0 M エタノールアミンを含む P B S 溶液を、流速 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で 6

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

71

0 μ L 流した。キャッピングの後、共鳴角度変化が一定になった時点と、ニュートロアビジン溶液を流す前と後との共鳴角度変化量を固定化量とした。このセンサーグラムでの固定化量は (S) が 3 6 9 0 R U、(R) が 3 4 8 0 R U となった。

次に、(S) には 4. 9 μ M、1 6. 3 μ M、4 9 μ M の 4-M a l 溶液を、(R) には 0. 4 9 μ M、4. 9 μ M の 4-G l c 溶液を流速 1 0 μ L / m i n で 6 0 μ L 流して固定化した。固定化されなかった過剰なリガンドを洗い流し、共鳴角度変化が一定になった時点と、固定化前との共鳴角度変化量をリガンドの固定化量とした。なおリガンドの固定化は、集合体を流しても固定化量が増えない状態に達するまで繰り返して行った。このセンサーグラムでの 4-M a l の固定化量は 2 2 0 R U、4-G l c の固定化量は 2 2 0 R U となり、2 種類の異なるリガンドが同程度に固定化されたリガンド導入チップが作製できた。同様の手法でリガンドの異なる種々のリガンド導入チップを作製した。

(5-2 リガンドの固定化についての検証)

合成したリガンドが、ビオチン-ニュートロアビジンの結合によりチップ上に固定化されているかどうかを、ビオチンを持たない比較例 1 で得たアセチルリンカー 1 5 によりマルトースを集合化させた化合物 1 8 (A c e-8-M a l) を用いて S P 測定で検証した。すなわち、5. 3-M a l と同じ条件で、A c e-8-M a l をニュートロアビジンが固定化されたチップ上に流し、これが固定化されなければ、非特異的なリガンドの固定化がないことを確認できる。

まず、上記 (5-1) と同様にニュートロアビジンを固定化させたアビジン付加チップを作製した。このときのニュートロアビジンの固定化

72

量は、(S) が 6620 RU、(R) が 6330 RU であった。このチップの (S) に順に、0.61 μ M の Ace-8-Mal 溶液、5.48 μ M の Ace-8-Mal 溶液、0.61 μ M の 5.3-Mal 溶液、5.48 μ M の 5.3-Mal 溶液を、流速 10 μ L/min で 60 μ L 流し、(R) には PBS だけを流し続けた。このときの (S) と (R) との差に相当する (D) のセンサーグラムを重ねて描いたのが、図 5 である。なお、同図では、Ace-8-Mal は Ace-Mal と、5.3-Mal は Bio-Mal と表記している。

図 5 に示すように、SPR 測定の結果からビオチンを含む 5.3-Mal が特異的にチップ上に固定化され、ビオチンを含まない Ace-8-Mal は、全く固定化されなかった。したがって、ビオチンリンカーを用いて糖分子を集合化した化合物 (リガンド) は、ビオチン-アビジン (ニュートロアビジン) の結合によって特異的にチップ上に固定化することができた。

(5-3 リガンド導入チップを用いた糖分子とレクチンとの相互作用)

上記 (5-1) で得られたリガンド導入チップに、種々の濃度のタンパク質の PBS 溶液を、流速 20 μ L/min で 60 μ L ずつ流し、SPR 測定により、リガンド導入チップとタンパク質との結合及び解離の挙動を観測した。

なお用いたタンパク質は以下の通りである。

- *) BSA (SIGMA ALBUMIN, BOVINE)
- *) Concanavalin A (コンカナバリン A, SEIKAGAKU KOGYO)
- *) Pea Lectin (エンドウマメレクチン, SEIKAGAKU KOGYO)

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

73

*) Peanut Lectin (ピーナツレクチン, SEIKAGAKU KOGYO)

*) RCA₁₂₀ (ヒマメレクチン, SEIKAGAKU KOGYO)

なお、上記タンパク質が導入されたリガンド導入チップは、該リガンド導入チップ表面に、10 mMの水酸化ナトリウム水溶液を60 μ L/minで60 μ L流すことによって解離させ再生させて、再使用した。この操作もセンサーグラムでレクチンを流す前のレゾナンスユニット値 (Response (RU ; Response Unit)) になるまで、1～3回繰り返して行った。

初めに、上記(5-1)で得られた、5.3-Ma1と8-G1cとを用いたリガンド導入チップで、Con Aとの相互作用を調べた。まず、上記(5-1)と同様にチップにニュートロアビジンを固定化させ、アビジン付加チップを得た。このときのニュートロアビジンの固定化量は、(S)が5470 RU、(R)が4380 RUであった。その後、アビジン付加チップの(S)に5.3-Ma1を、(R)に8-G1cを固定化し、リガンド導入チップを得た。なお、リガンドの固定化量は、(S)は390 RU、(R)は390 RUであった。

このように作成したリガンド導入チップに、1.0 MのCon A溶液を流速10 μ L/minで60 μ L流した。このとき観測された(S)、(R)および両者の差に相当する(D)の共鳴角度変化を図6に示す。図6に示すように、Con A溶液を流すとリガンド導入チップ上のリガンドとCon Aとが結合して、(S)、(R)とも共鳴角度が上昇した。次に結合に関与しなかったCon Aを洗い流してPBSを流速10 μ L/minで約1000秒流した後、10 mM水酸化ナトリウム水溶液を流速60 μ L/minで60 μ L流し、リガンドに結合したCon Aを解離さ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

74

せた。解離にともなう共鳴角度の急激な減少が見られ、共鳴角度がCon Aを流す前のベースラインと同じレベルで一定になったことから、Con Aが完全に解離したことが分かった。同図中の(D)は、結合、解離を表す典型的なSPRセンサーグラムと同様になった。すなわちこの系でCon Aとグルコピラノースとの特異的な相互作用を観測できた。

さらに、上記リガンド導入チップに様々な濃度のCon Aを作用させ相互作用をSPR測定した。また、BSA、およびPSAとの相互作用についてもSPR測定し共鳴角度変化を観測した。

以上の結果から、以下のことが明らかとなった。すなわち、合成したビオチンリンカーによって糖分子を集合化させたリガンドは、アビジン（ニュートロアビジン）を固定化させたチップ上に固定化することができる。またCon Aとグルコピラノースとの特異的な相互作用を解析することができる。

また、リガンド導入チップを用いた「2チャンネル解析法」によって、タンパク質との非特異的な相互作用を打ち消すことができると結論した。また、ConAと同様、グルコピラノース認識レクチンとされるPSAが特異的に相互作用しなかったことから、糖認識能を持つレクチンでも、チップ上に固定化された糖分子とは結合の程度に差が出るということが分かった。

また、本発明の4-Ma1及び4-G1cと、比較例である2-Ma1及び2-G1cとを固定化させたリガンド導入チップを作製し、これを用いて様々な濃度の、Con A, BSA, PSA, RCA₁₂₀, PNA溶液を流し、SPR測定して共鳴角度変化を観測した。

糖分子の集合化の度合いによるレクチンとの相互作用の違いについて

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

75

、得られた結果をまとめて表 1 に示した。

リガンド	たんぱく質	$K_D/\mu\text{M}$	$k_a/\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}\times 10^4$	$k_d/\text{s}^{-1}\times 10^{-2}$
4-Mal, 4-Glc	1.0 μM Con A	0.59 ± 0.06	1.2 ± 0.12	0.72 ± 0.021
2-Mal, 2-Glc	1.0 μM Con A	0.96 ± 0.05	1.5 ± 0.86	1.4 ± 0.86

K_D (k_d/k_a): 解離定数、 k_a : 結合速度定数、 k_d : 解離速度定数

表 1 より、解離定数 (K_D) は値が小さいほど分子間の結合が強いことを表している。表 1 を用いて、同じアナライトに対する解離定数を比較すると、4 単位の糖分子が集合した系が、2 単位の系の約 $2/3$ の値であることがわかる。すなわち糖をより多く集合化させたことにより、Con A との結合が強くなったことが確認された。

さらに詳細な検討をするために Con A とリガンドとの結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d) を比較すると次のことが明らかになった。すなわち両者の結合速度には差がないが、解離速度は、糖分子を 4 単位有するリガンドが 2 単位のもの約 $1/2$ の値であり、比較的大きな差が見受けられた。つまり糖分子を 4 単位有するリガンドでは、結合した Con A が解離しにくい状況にあるということが分かった。集合化させる糖分子の数を増やすと、結合速度には変化は出ないが、一度結合した Con A が解離した後に再結合する機会が増えて解離速度が低下し、この影響により解離定数が小さな値になったと考えられる。この結果から本発明のリンカー化合物は糖分子を集合化させ、クラスター効果によって相互作用する分子との結合を強めることが確認された。

次に、糖分子を変えて、ガラクトースとガラクトース認識レクチンの相互作用を解析した。上記 (5-1) で得た末端のガラクトースの有無だけが異なる 4-Lac と 4-Glc とをニュートロアビジンチップに

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

76

固定化したリガンド導入チップを用いた。濃度の異なるRCA₁₂₀、また、PNAを用いて上記と同様のSPR測定を行った。また、4-Lacと4-Glcとのリガンド導入チップに、様々の濃度のCon A, BSA, PSA, RCA₁₂₀, PNA溶液を流してSPR測定を行い、共鳴角度変化(D)を観測した。これらの観測結果から、ラクトースを集合化させたリガンドを用いれば、ガラクトースとガラクトース結合レクチンRCA₁₂₀及びPNAとの特異的な相互作用を解析することができることが明らかになった。

以上により得られたSPR測定の結果から以下のことが言える。

- 1) 本研究で合成したリンカーを用いて糖分子を集合化させたリガンドを、ビオチン-アビジン(ニュートロアビジン)の結合によってSPRセンサチップ上に固定化させることができた。
- 2) 「2チャンネル解析法」と称される、末端の糖分子以外が同じ構造である対照リガンドを用いる方法によって、SPR測定で一番問題となる非特異的な相互作用を相殺して、糖とタンパク質との特異的な相互作用を検出することを可能にした。
- 3) 集合化度の異なる糖リガンドを固定化させた糖チップを用いることによって、クラスター効果による糖分子とレクチンとの結合の増強を観察することができた。

以上のように、本発明のリンカー化合物は、糖分子を集合化し、得られる集合体(リガンド導入チップ)は、SPR測定によるレクチンと糖との相互作用解析に充分適用できるものである。

〔実施例6・アフィニティクロマトグラフィ〕

(6-1 アフィニティカラム作製)

実施例4で合成したリガンドを用いてアフィニティカラムを作製した

。一般に行われているアフィニティカラムの作製法に従い、実施例 4 で得られたリガンド 4-Ma 1 を固定化したアフィニティカラムを作製した。カラム担体は Amersham 社製 Hitrap NHS-activated Hp (カラム体積 1 mL) を用いた。これはゲルマトリックスにスパーサを介して活性基として N-ヒドロキシスクシンイミドが固定化されており (ゲル 1 mL 当たり 10 mmol NHS 基)、アミノ基を持つ化合物を担体上に固定化させるのに適している。アフィニティカラムの作製手順の概略を図 6 に示す。

カラムへの溶液の注入は、カラムに接続した 1 mL もしくは 5 mL のシリンジ (商品名: テルモシリンジ、ガンマ線滅菌済み 1 mL, 5 mL) を用いて、カラムの下端から流出する溶液が毎秒 1 滴の流速となるよう手動で行った。また、全ての溶液はシリンジフィルター (Millex-GS Syringe Drive Filter Unit 0.22 μ m) を用いてろ過したものを用いた。バッファーとして以下の 1~3 の溶液を調製した。

1) ニュートロアビジンカップリングバッファー (0.5 M 塩化ナトリウム含有の 10mM 酢酸ナトリウム水溶液 pH 5.5)

2) ブロッキングバッファー (0.5 M 塩化ナトリウム含有の 0.5 M エタノールアミン水溶液 pH 8.3)

3) 洗浄バッファー (0.5 M 塩化ナトリウム含有の 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液 pH 4.0)

N-ヒドロキシスクシンイミドがゲル担体に固定化されたゲル担体を充填してある活性化カラム (Amersham 社製 Hitrap NHS-activated HP) 1 mL に、氷冷した 1 mM 塩酸 1 mL を通じ充填されていたイソプロ

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

78

パノールを除去した。その後すぐ2.0 mg/mLのニュートロアビジン カップリングバッファー溶液1 mLを通じ、密栓し室温で30分放置した。次にブロッキングバッファー6 mLを通じて密栓し、室温で30分放置したあと、洗浄バッファー6 mL、ブロッキングバッファー6 mL、PBS 6 mLを順に通じた。その後0.5 mg/mLのリガンド(4-Mal) PBS溶液を1 mL通じ、密栓し室温で30分放置した。その後PBS 5 mLを通じて過剰なリガンドを洗い流した。

(6-2 アフィニティクロマトグラフィ)

上記(6-1)で得られたアフィニティカラムを用いて、リガンドと相互作用するタンパク質と、相互作用しないタンパク質とを分離した。なお、用いたタンパク質は以下の3種類である。

*) BSA (SIGMA ALBUMIN, BOVINE)

*) Concanavalin A (Con A, SEIKAGAKU KOGYO)

*) Pea Lectin (PSA, SEIKAGAKU KOGYO)

実施例5の(5-3)のSPR測定の結果から、Con Aは4-Malと強く結合し、水酸化ナトリウム水溶液によって解離することが分かっている。またPSAおよびBSAは特異的に相互作用しないことも分かっている。

以上のことから、これらのタンパク質の混合溶液をアフィニティカラムに通すと、Con Aのみが4-Malに結合してカラムに保持され、それ以外は素通りして溶出されると予想した。保持されたCon Aは、水酸化ナトリウムを含むPBS溶液をカラムに通じることで溶出されることが考えられる。または結合阻害剤としてグルコース溶液をカラムに通じても溶出されることが考えた。なお、このアフィニティクロマトグラフィの手順

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

79

を、図7に示す。

初めに、(6-1)で作製したカラムに、それぞれのタンパク質の最終濃度が1 mMになるように調整したタンパク質混合PBS溶液1 mLを通じ、密栓し5分室温で放置した。

続けてPBS 5 mLを通じ、流出液を1 mLずつ集めた(Mix-1.2.3.4.5とした)。次に解離剤として順に0.1 mM, 1.0 mM, 1.0 mM, 1 MグルコースPBS溶液を5 mLずつ通じ、それぞれの流出液を1 mLずつ集めた(順に0.1Glc-1 ~5, 1Glc-1 ~5, 10Glc-1 ~5, 1000Glc-1 ~5とした)。PBS 5 mLを通じてカラムを洗浄後、1.0 mM水酸化ナトリウムPBS溶液5 mLを通じ、流出液を1 mLずつ集めた(NaOH-1.2.3.4.5とした)。

(6-3・タンパク質の同定)

上記(6-2)のアフィニティクロマトグラフィにより、集めた画分は紫外分光計を用いて波長280 nmでの吸光度を測定し、吸収が認められた画分を、以下のようにSDS-PAGEにかけた。

初めに以下の溶液を調製した。なお、全ての溶液はシリンジフィルター(Millex-GS Syringe Drive Filter Unit 0.22 µm)を用いてろ過してから用いた。

*) 0.5 M Tris-HCl 緩衝溶液 pH 6.8

*) 泳動槽用緩衝溶液 (ナカライテスク製 泳動用緩衝溶液使用)

*) サンプル調整用バッファー (SDS 0.3 mg, 2-メルカプトエタノール 0.3 mL, グリセリン 6 mL, 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液 3 mL, イオン交換水 1 mL)

*) マーカー色素溶液 (ブロムフェノールブルー 1 mg, グリセリン 0.

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

80

1 mL, イオン交換水 0.9 mL)

*) クマジーブリリアントブルー染色液 (ナカライテスク製ラピッドステインCBBキット使用)

集めた画分 1 mL を凍結乾燥してから、イオン交換水 100 μ L を加え再度溶解させた。この溶液 20 μ L とサンプル調整用バッファー 10 μ L を混合し、95 $^{\circ}$ C で 10 分加熱してサンプル溶液を調整した。泳動用緩衝溶液を充填した電気泳動槽に既成ゲル (ATTO PAGEL-Compact AE-6000 (SDS 12.5%含有)) をセットし、各レーンに、マーカー色素溶液を 1 μ L と、変性させたサンプル溶液を 10 μ L ずつのせ 20 mA の一定電流で泳動させた。スタンダードとして Prestained protein marker. Low range (ナカライテスク製) を同時に泳動した。泳動終了後ゲルを取りだし、クマジーブリリアントブルー染色液に浸し室温で 50 分振盪させた (New Brunswick Scientific 社製 Bio Dancer 使用)。振盪後ゲルをイオン交換水で洗浄し、さらに 60 $^{\circ}$ C のイオン交換水に浸し脱色させた。脱色したゲルは乾燥させて保存した。

具体的には、12.5%アクリルアミドゲル (ATTO PAGEL-Compact AE-6000) を用いて SDS-PAGE を行い、クマジーブリリアントブルーによって染色した。この結果が図 8 である。図 8 に示すように、Mix-2 画分までは Con A, PSA, BSA の 3 つバンドが見られ、これらが溶出されていることがわかる。Mix-3 では BSA, PSA のバンドが消え、Con A のバンドだけが現れている。それ以降の画分には BSA, PSA のバンドは見られず、Mix-4, Mix-5, 10Glc-1, NaOH-2 のいずれの画分にも Con A のバンドが見られた。これらの結果から、次の 2 つのことが分かった。

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

81

(1) BSA, PSAはカラムを素通りした。(過剰量のタンパク質をアプライしたために吸着されるはずのCon Aの一部も溶出されていて、Mix-2にも3つのタンパク質すべてが見られる。)

(2) 大部分のCon Aは、担体上の4-Ma1と結合して保持され、溶離剤によってカラムから溶出する。

以上の結果からわかるように、4-Ma1を固定化させたアフィニティカラムを用いて、Con AとPSAとBSAとの混合溶液からCon Aだけを選択的に分離することができた。

尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

産業上の利用の可能性

本発明のリンカー化合物は、以上のように、4単位以上の糖分子を導入可能な部位として、4つの芳香族アミノ基を有している。また、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質の検出や分離を行う際に用いられるタンパク質分析用の支持体に結合可能な部位として、ビオチン部位又はイミノビオチン部位を有している。また、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用の影響をほぼ無視することができる。

また、本発明のリガンドは、上記リンカー化合物に糖分子を導入してなるものである。

したがって、本発明は、リンカー化合物やリガンドを利用し、生体分

82

子の相互作用を検出するバイオテクノロジー産業に利用することが可能となる。特に、チップテクノロジーやアフィニティカラムを使用する分野に利用することができる。また、バイオプローブやバイオセンサーを利用する分野、さらに、製薬の分野や診断・検査等の医療技術にも利用することが可能となる。

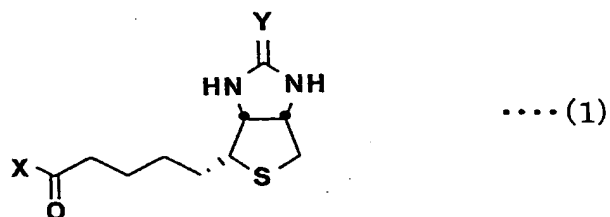
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

83

請求の範囲

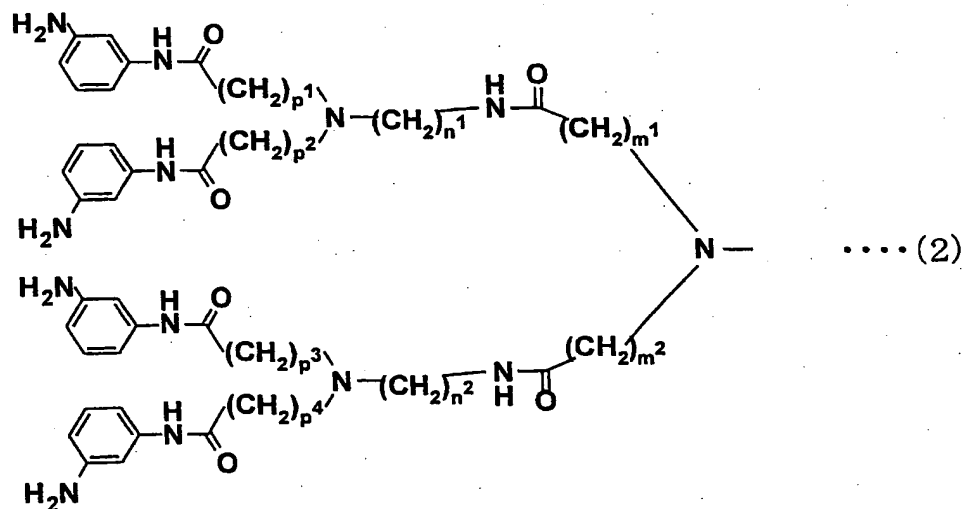
1. 一般式 (1)



(式中、YはO又はNHで表される構造を有する) にて表される構造を備え、

上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多岐部位である構造を備えていることを特徴とする多岐用途型リンカー化合物。

2. 上記Xは、一般式 (2)



WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

84

(式中、 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , p^1 , p^2 , p^3 , p^4 は、それぞれ独立して、1以上6以下の整数)にて表される構造を備えていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の多岐用途型リンカー化合物。

3. 上記一般式(2)において、 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , p^1 , p^2 , p^3 , p^4 は、全て2にて表される構造を備えていることを特徴とする請求の範囲第2項記載の多岐用途型リンカー化合物。

4. 請求の範囲第1項ないし第3項の何れか1項に記載の多岐用途型リンカー化合物の芳香族アミノ基に、糖分子を導入してなることを特徴とするリガンド。

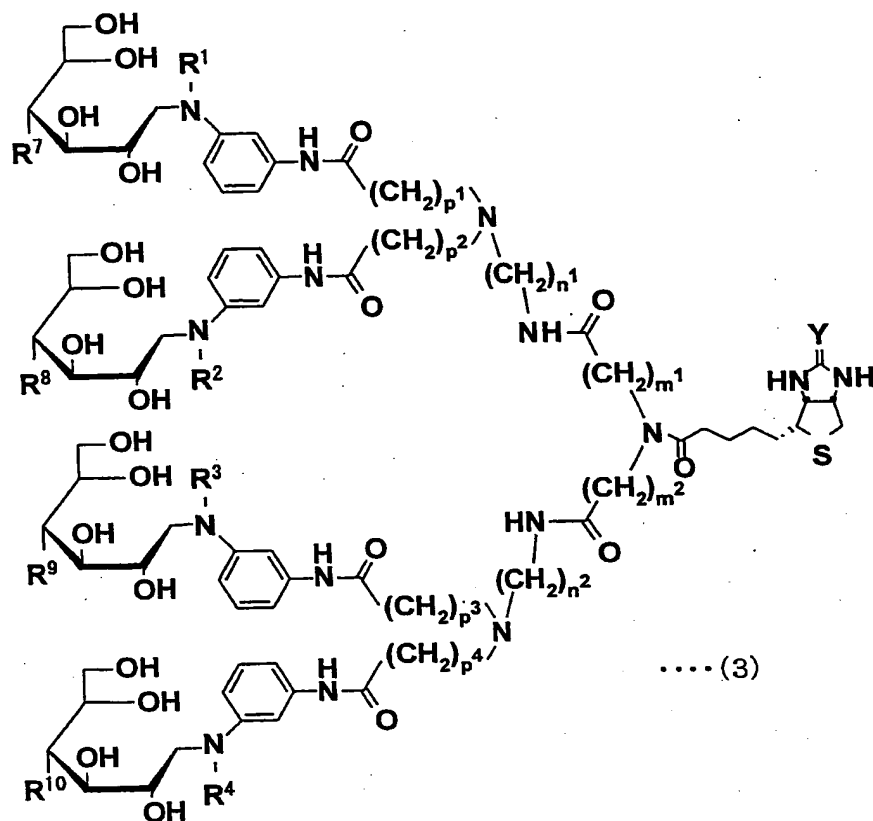
5. 上記糖分子は、単糖類、オリゴ糖類、多糖類のいずれかであることを特徴とする請求の範囲第4項のリガンド。

6. 一般式(3)

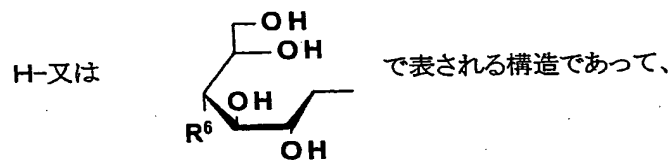
WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

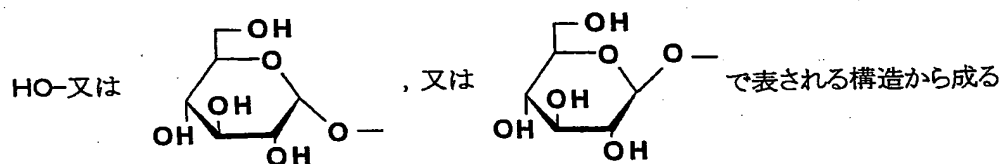
85



(式中、YはO又はNHで表される構造を有し、 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 は、それぞれ独立して、



R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} は、



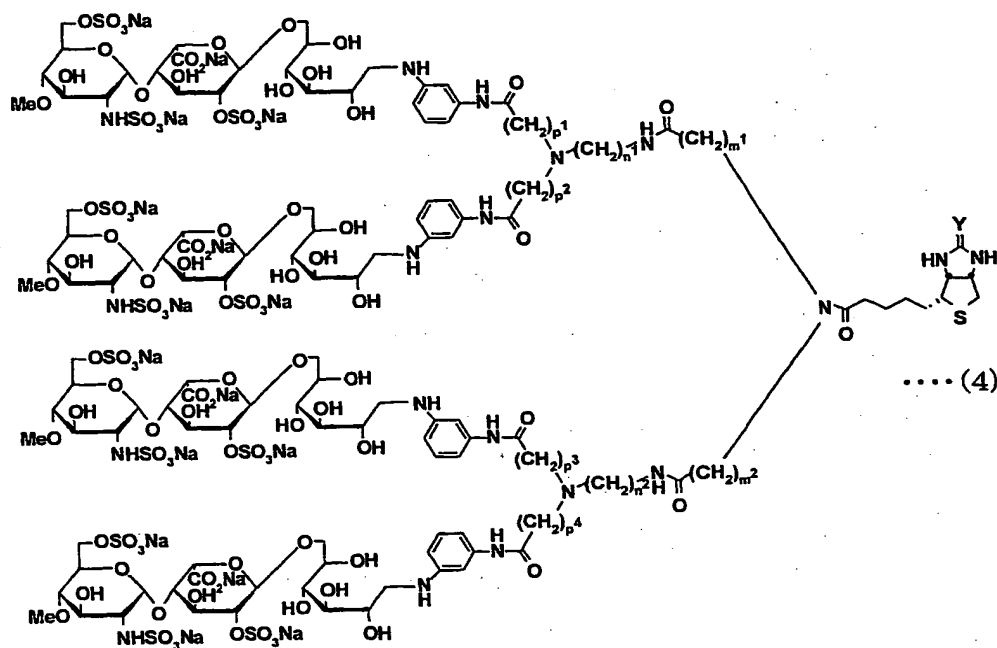
群より選ばれる構造を有する)

(式中、 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , p^1 , p^2 , p^3 , p^4 は、それぞれ独立して

86

、1以上6以下の整数)にて表される構造を備えていることを特徴とするリガンド。

7. 一般式(4)



(式中、YはO又はNHで表される構造を有し、 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , p^1 , p^2 , p^3 , p^4 は、それぞれ独立して、1以上6以下の整数である)にて表される構造を備えていることを特徴とするリガンド。

8. ビオチン系化合物と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を4鎖有するアミン化合物との縮合反応を行うステップと

上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護するステップとを含んでい
ることを特徴とする多岐用途型リンカー化合物の製造方法。

9. 請求の範囲第1項ないし第3項の何れか1項に記載の多岐用途型
リンカー化合物と、糖分子とを用いて、還元アミノ化反応を行うことを

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

87

特徴とするリガンドの製造方法。

10. 糖分子を支持体の表面に配列させる糖分子の導入方法であって

請求の範囲第4項ないし第7項の何れか1項に記載のリガンドを含む溶液と、表面にストレプトアビジンまたはアビジンが固定されている支持体とを接触させることを特徴とする糖分子の導入方法。

11. 請求の範囲第4項ないし第7項の何れか1項に記載のリガンドを、ビオチン部位又はイミノビオチン部位と、ストレプトアビジン又はアビジンとの結合であるビオチン-アビジン結合を介して支持体の表面に固定化させてなることを特徴とするリガンド担持体。

12. 上記支持体には、ストレプトアビジンまたはアビジンが固定化されていることを特徴とする請求の範囲第11項に記載のリガンド担持体。

13. 表面プラズモン共鳴測定用のセンサチップとして用いられる請求の範囲第11項または第12項に記載のリガンド担持体。

14. アフィニティクロマトグラフィ用のカラムに用いられる請求の範囲第11項または第12項に記載のリガンド担持体。

15. 支持体表面に糖分子が固定化されているセンサチップを用いて、糖分子の相互作用を検出する表面プラズモン共鳴の測定方法であって

末端構造が異なる糖分子が導入されてなる少なくとも2つのセンサチップを用いて、

上記少なくとも2つのセンサチップは、第1の糖分子が支持体表面に固定化されてなる第1のセンサチップと、上記第1の糖分子とは末端構

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

88

造が異なる第2の糖分子が支持体表面に固定化されてなる第2のセンサチップとを含み、

第1のセンサチップを用いて得られた検出結果と、第2のセンサチップを用いて得られた検出結果との差を測定することを特徴とする表面プラズモン共鳴の測定方法。

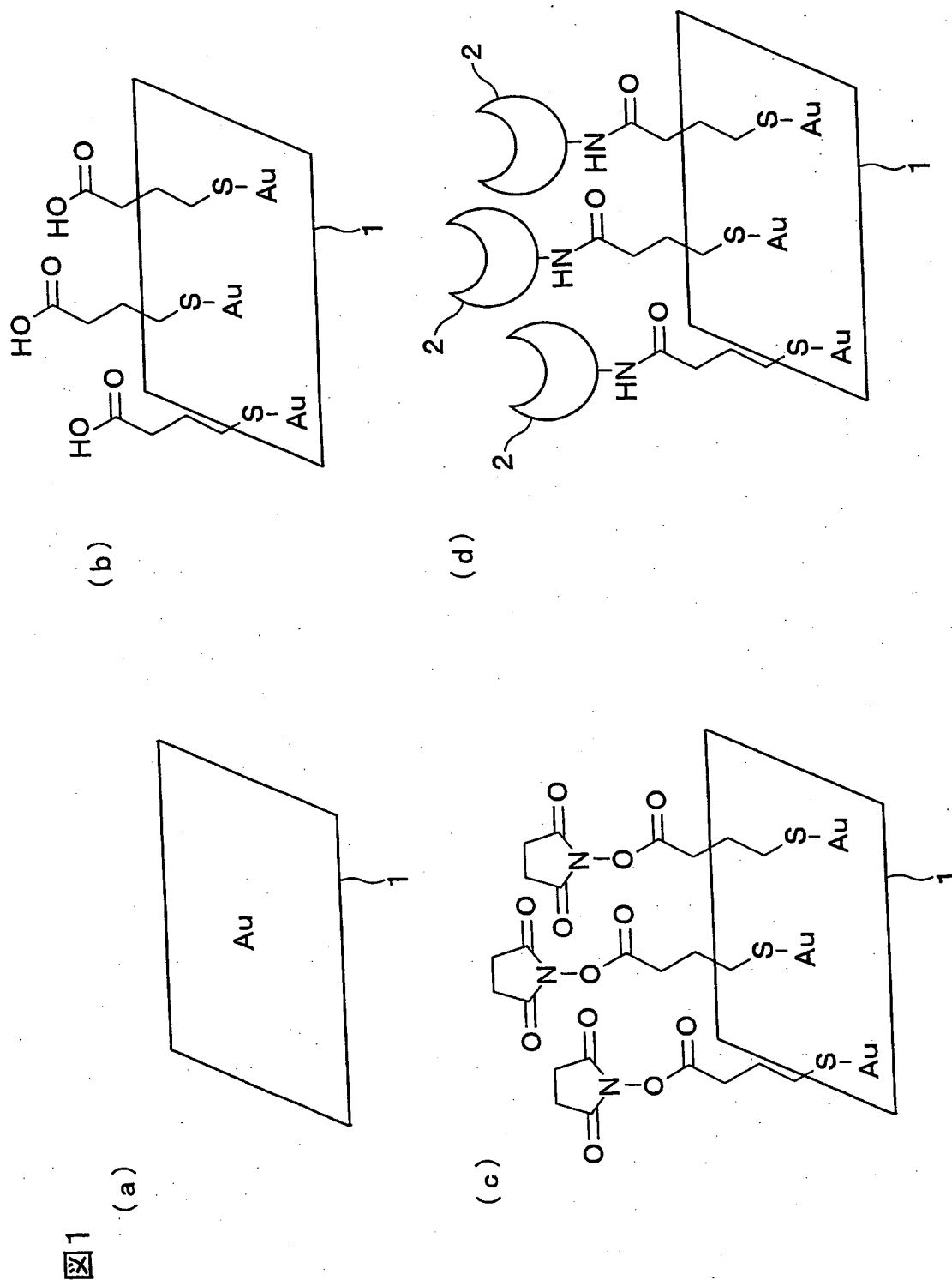
16. 上記センサチップに、請求の範囲第1項または第3項に記載の同一の構造のリンカー化合物を用いて糖分子が固定化されることを特徴とする請求の範囲第15項に記載の表面プラズモン共鳴の測定方法。

17. 上記センサチップに、略同数の糖分子が固定化されることを特徴とする請求の範囲第15項または第16項に記載の表面プラズモン共鳴の測定方法。

WO 2004/022565

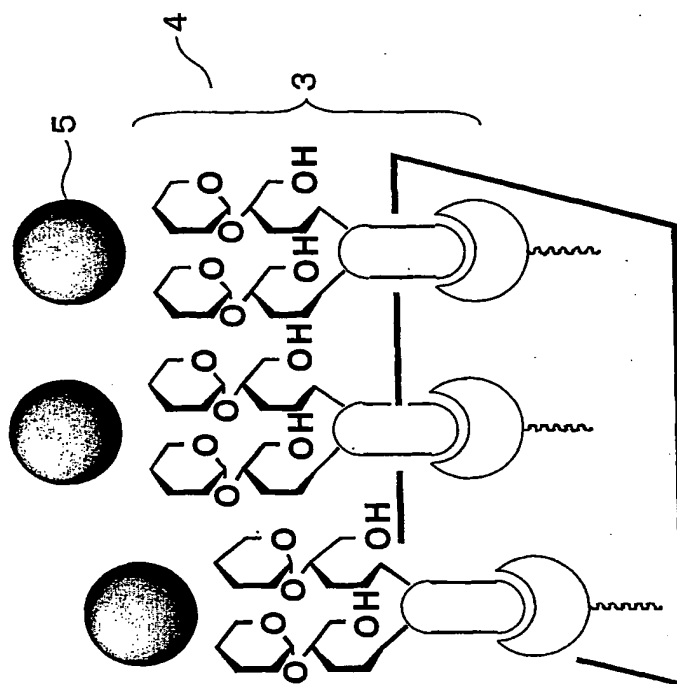
PCT/JP2003/009973

1/9

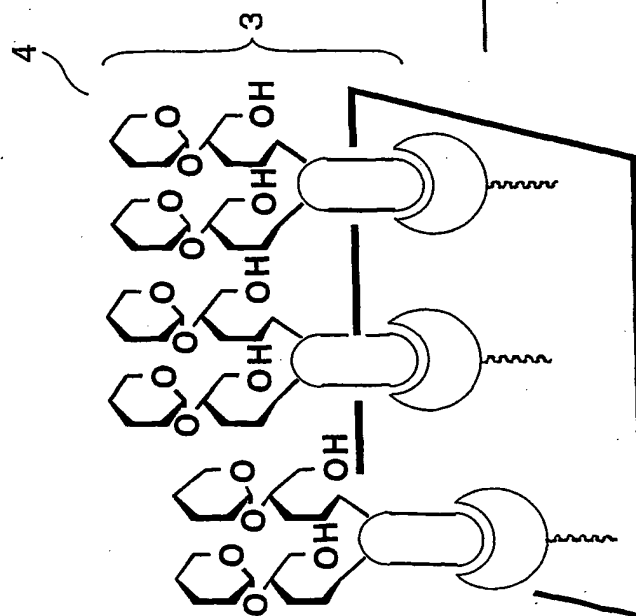


PCT/JP2003/009973

(b)



(a)



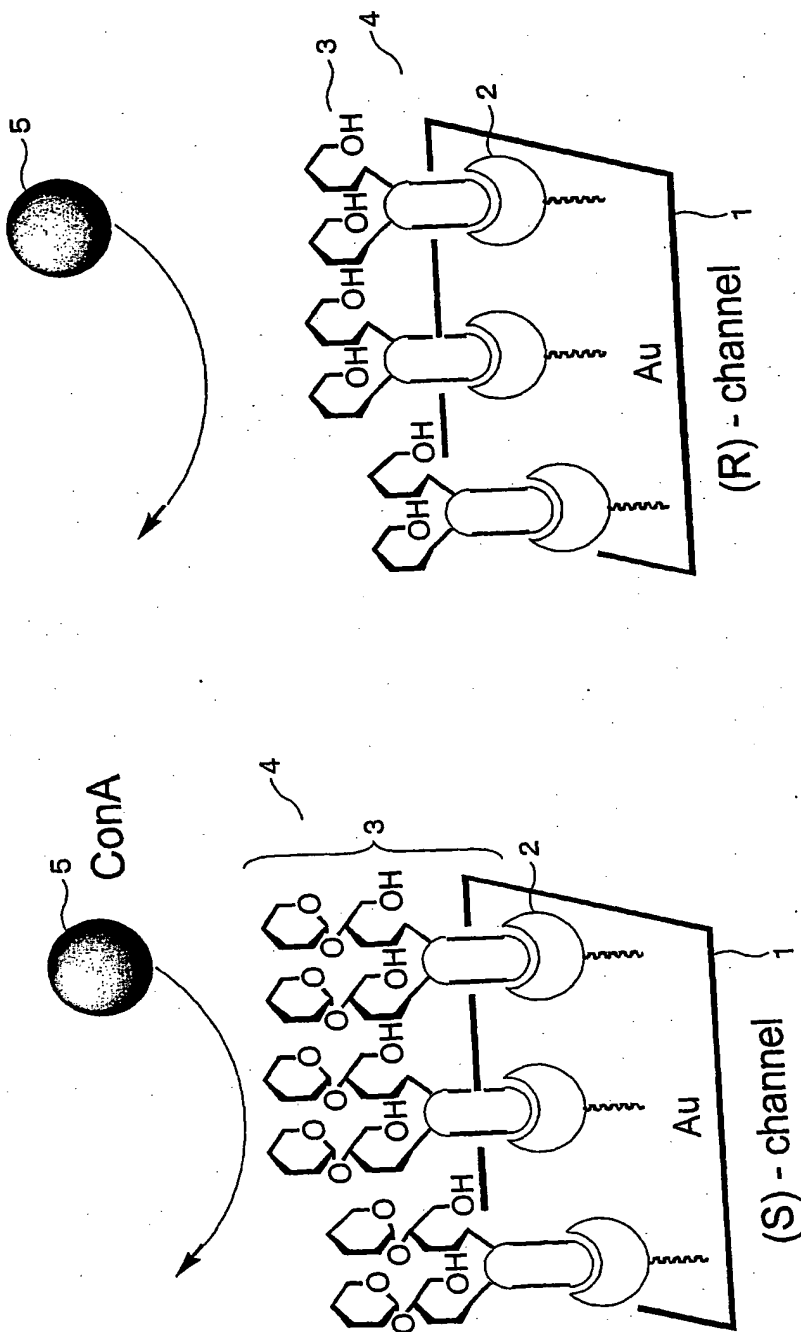
2

WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

3 / 9

Fig 3

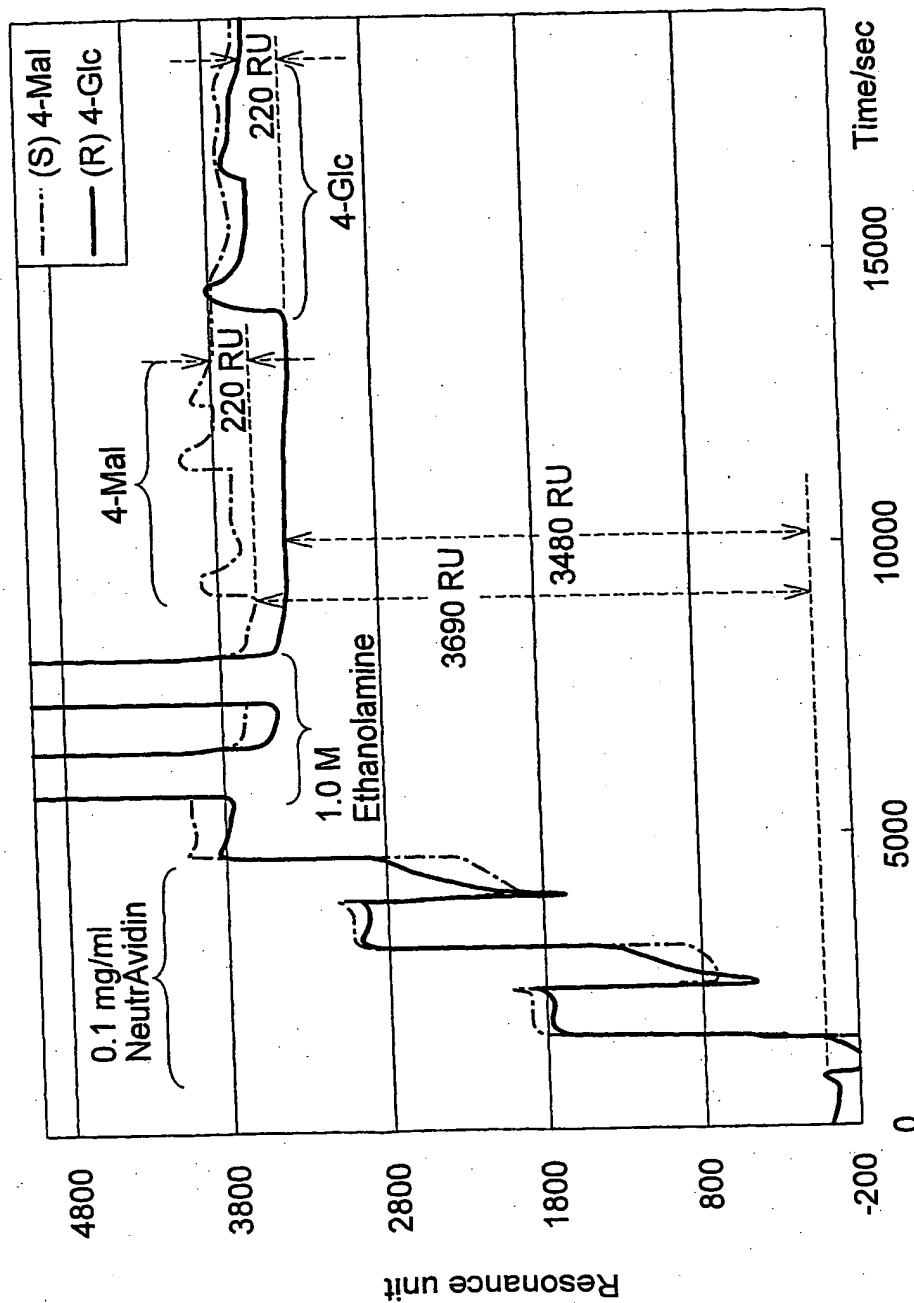


WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

4/9

図4

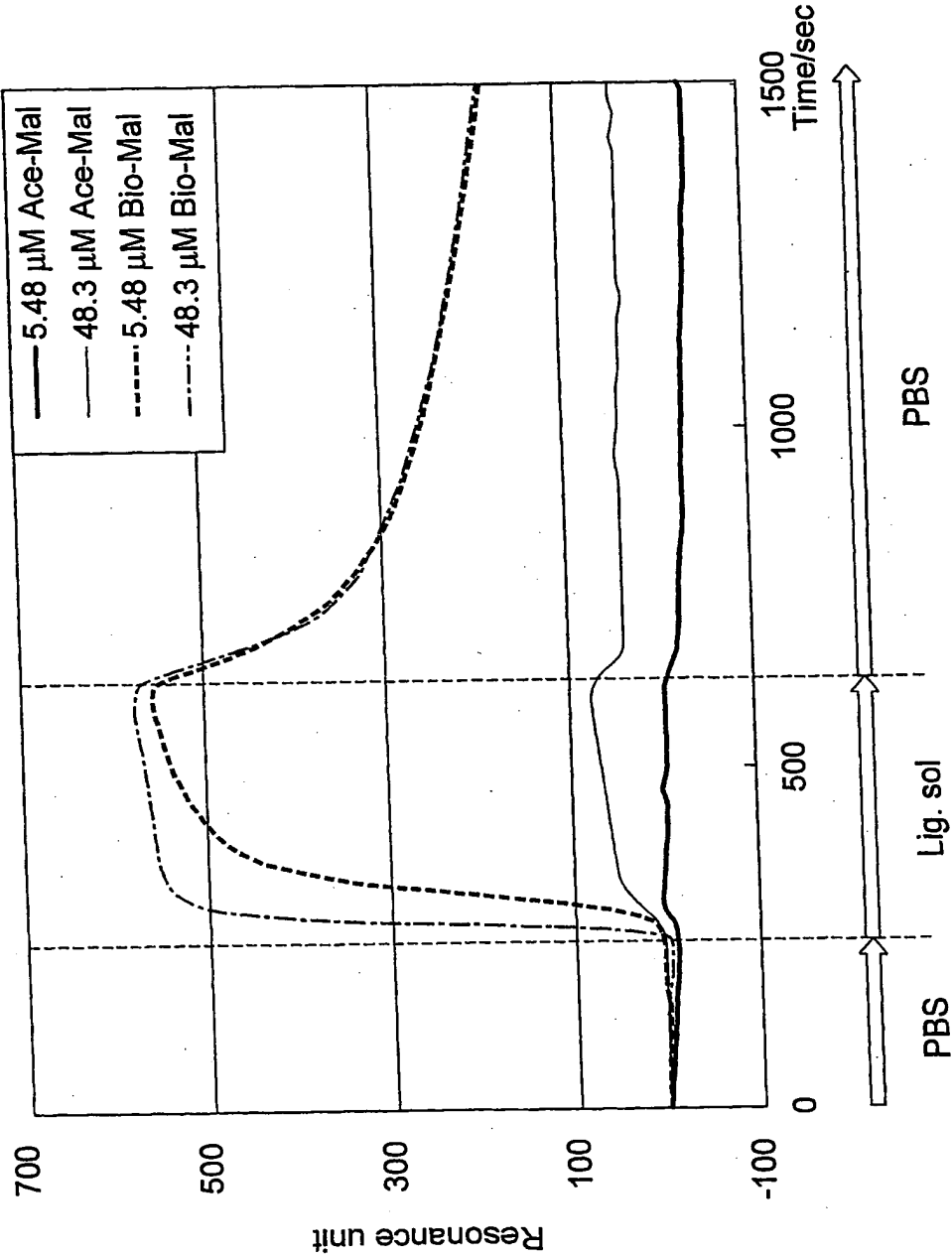


WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

5/9

図5



6/9

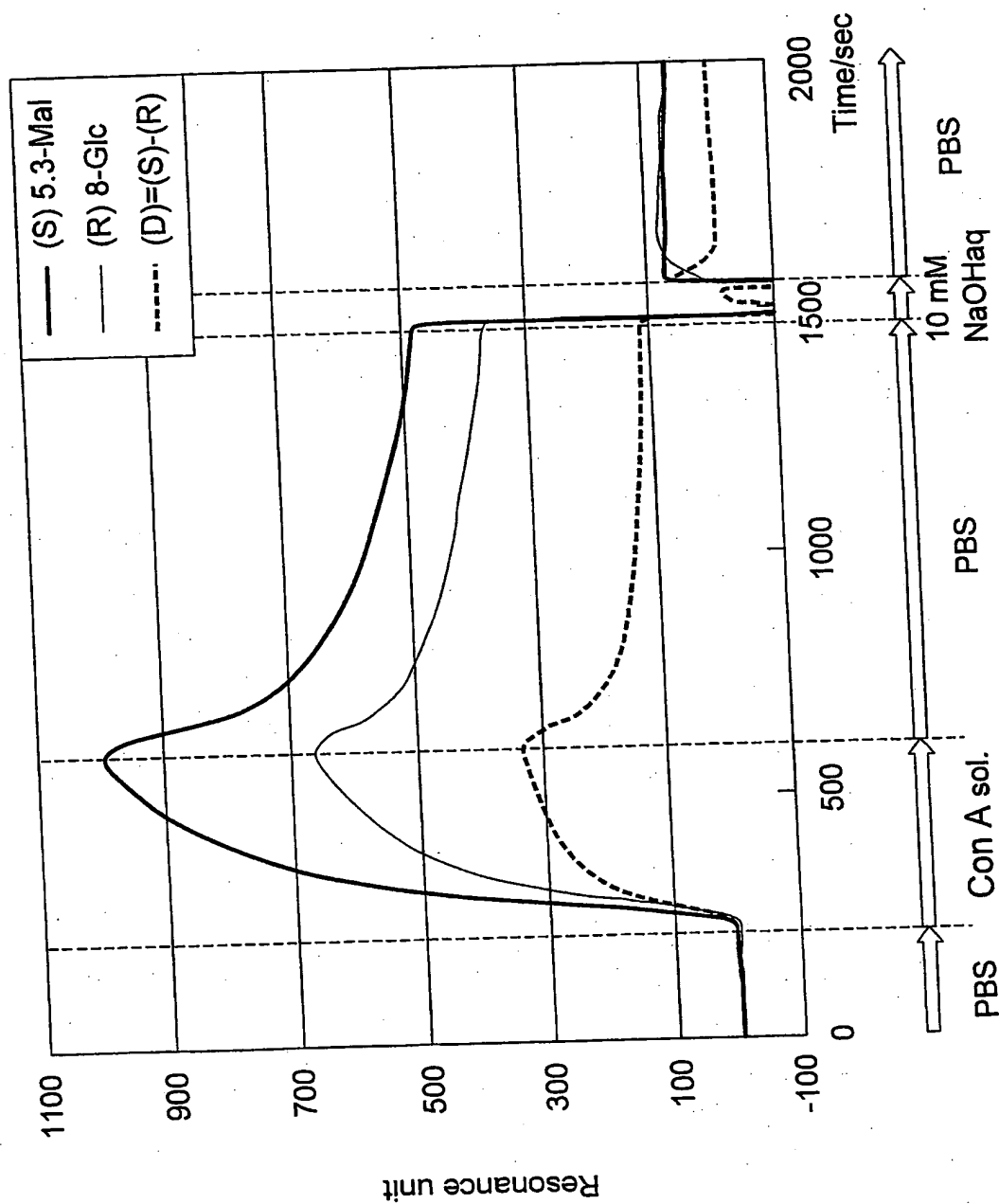
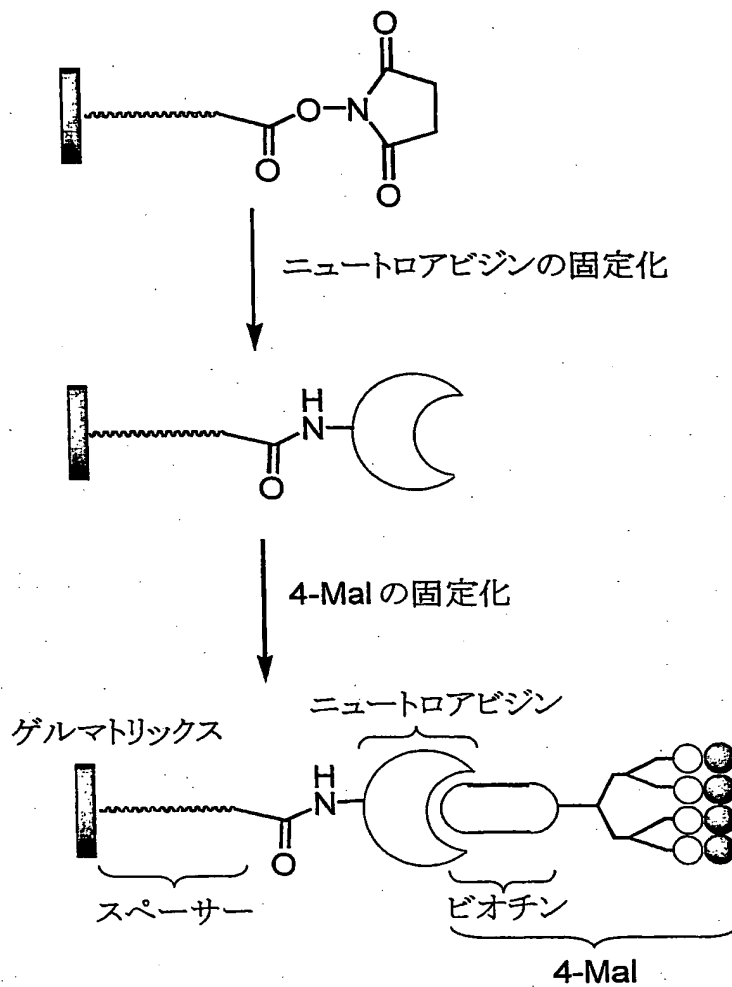


图6

7/9

図7

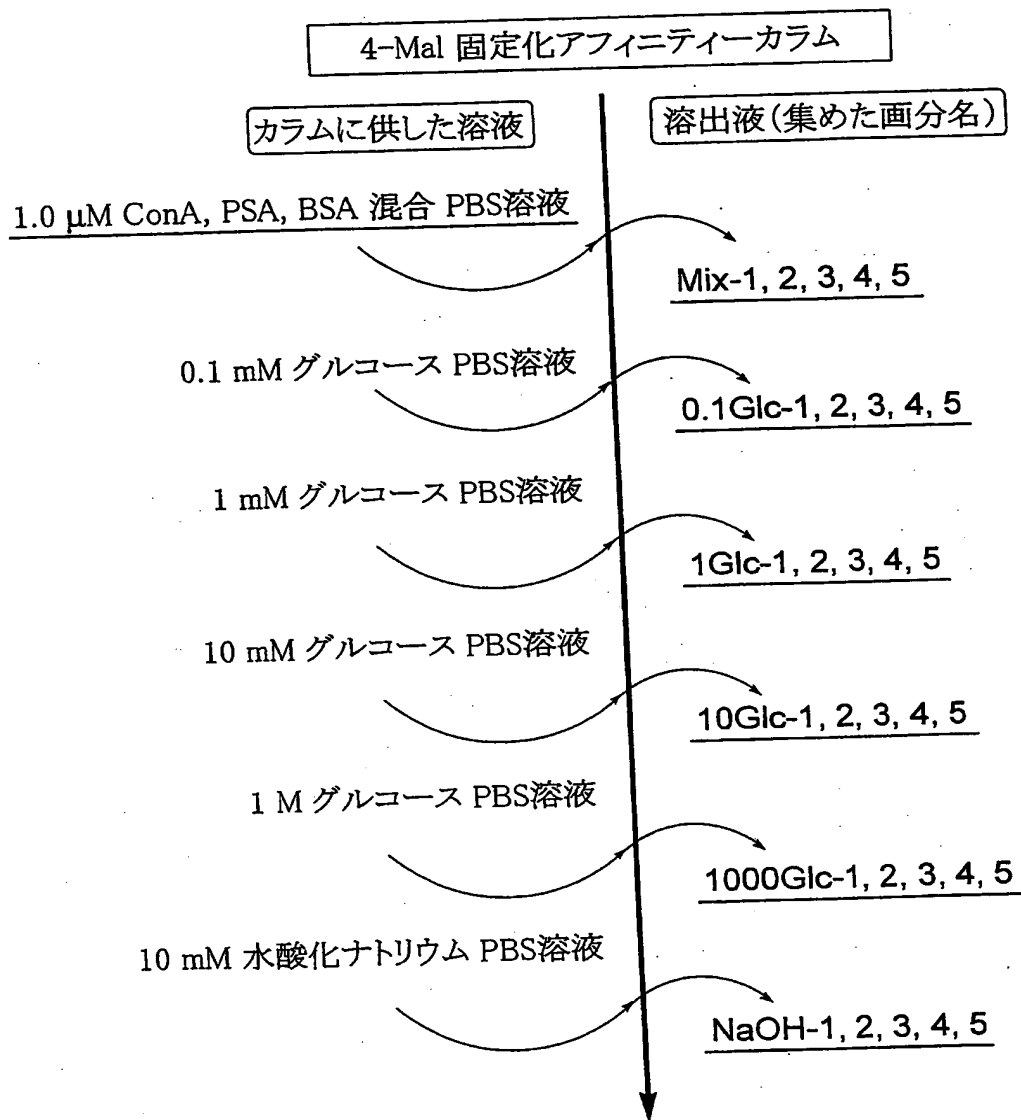


WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

8/9

図8

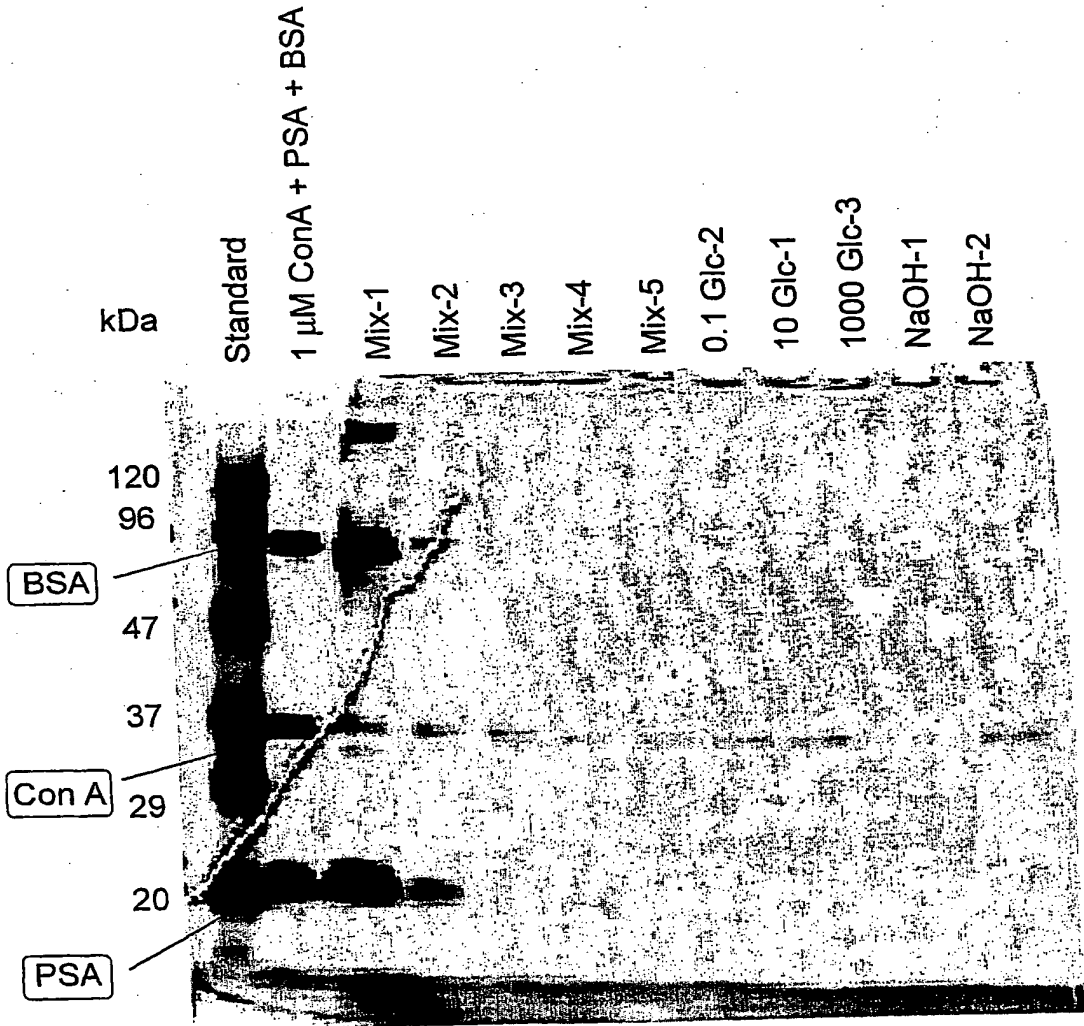


WO 2004/022565

PCT/JP2003/009973

9/9

図9



PCT/JP2003/009973

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年08月05日 (05.08.2003) 火曜日 17時04分14秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 科学技術振興事業団は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1	開示の種類	刊行物
(i) VIII-5-1	開示の日付:	2003年02月07日 (07.02.2003)
(ii) VIII-5-1	開示の名称:	「多岐用途型リンカーを用いた糖鎖の集合化とその機能研究」(第49回 大阪大学大学院理学研究科 博士前期課程 化学専攻・高分子科学専攻 業績発表会要旨集 2002年度、53頁)
(iii) VIII-5-1	開示の場所:	
(iv) VIII-5-1	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	国内特許又は広域特許のための AP: (GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW); EA: (AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM); OA: (BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG); AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW の指定

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07D495/04, C07H15/203, G01N33/53, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07D495/04, C07H15/203, G01N33/53, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), CAOLD (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN),
EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	HAYASHI, KUSUMOTO et al., "Taki Yotogata Linker o Mochiita Tosa no Shugoka to Hyomen Plasmon Kyomeiho Kaiseki Narabi ni Affinity Chromatography eno Oyo", CSJ: The Chemical Society of Japan Yokoshu, 03 March, 2003 (03.03.03), Vol.83rd, No.2, page 952, 2 G2-48	1-17
P, X	HAYASHI, KUSUMOTO et al., "Tosa no Shugoka to Koteika no Tame no Shinki Linker Bunshi no Gosei", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 10 September, 2002 (10.09.02), Vol.82nd, page 137, 1 C1-12	1-17
P, Y	JP 2003-83969 A (Japan Science and Technology Corp.), 19 March, 2003 (19.03.03), (Family: none)	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 December, 2003 (02.12.03)Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09973

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAYSHI, ARANO et al., 'Ryusanka Oligo-to no Shugoka, Biotin-ka oyobi Sono Hyomen Plasmon Kyomei eno Oyo', CSJ: The Chemical Society of Japan Yokoshu, 2001, Vol.79th, No.2, page 1042, 4G304	1-17
Y	JP 7-252288 A (Seikagaku Corp.), 03 October, 1995 (03.10.95), Full text; pages 6 to 8 (Family: none)	1-17
Y	FUKASE, K. et al., 'Functional fluorescence labeling of carbohydrates and its use for preparation of neoglycoconjugates.', J. Carbohydrate Chemistry, 1994, Vol.13, No.5, pages 715 to 736; full text; page 723	1-17
Y	JP 2002-80488 A (President of Osaka University), 19 March, 2002 (19.03.02), Full text; Claims (Family: none)	1-17
Y	WO 96/17613 A1 (NEORX CORP.), 13 June, 1996 (13.06.96), Full text; Claims; Fig. 2C & EP 794788 A1 & JP 2001-525790 A & US 5886143 A & US 5985826 A	1-17
Y	LINDHORST, T.K. et al., 'Glycocoating of oligovalent amines: synthesis of thiourea-bridged cluster glycosides from glycosyl isothiocyanates.', Angewandte Chemie, International Edition in English, 1996, Vol.35, No.17, pages 1953 to 1956	1-17
Y	WELLS, N.J. et al., 'Solid-phase dendrimer synthesis.', Biopolymers, 1999, Vol.47, No.5, pages 381 to 396	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09973

<Subject of search>

The terminal structure X of the compound of the formula (1) according to the invention of claim 1 is restricted only in having "a multibranched site structure involving 4 hydrocarbon derivative chains each having an aromatic amino group at the end and optionally having a carbon-nitrogen bond in the main chain". Since there are X structures over a broad scope corresponding thereto, claim 1 involves a great number of compounds.

However, only part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Such being the case, the search was made mainly on the part specifically supported by the description and disclosed therein, namely, the compounds represented by the formulae (2), (3) and (4) in claims 2, 6 and 7.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/09973

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07D495/04, C07H15/203, G01N33/53, G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07D495/04, C07H15/203, G01N33/53, G01N33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus (STN), REGISTRY (STN), CAOLD (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	林・楠本他 ‘多岐用途型リンカーを用いた糖鎖の集合化と表面プラズモン共鳴法解析ならびにアフィニティークロマトグラフィーへの応用’ 日本化学会予稿集, 3 Mar. 2003, vol. 83rd, no. 2, p. 952 2 G2-48	1-17
P, X	林・楠本他 ‘糖鎖の集合化と固定化のための新規リンカー分子の合成’ 日本化学会講演予稿集, 10 Sep. 2002, vol. 82nd, p. 137 1 C1-12	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/09973

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, Y	JP 2003-83969 A (科学技術振興事業団) 2003.03.19 (ファミリーなし)	1-17
Y	林・荒野他 '硫酸化オリゴ糖の集合化、ビオチン化およびその表面プラズモン共鳴への応用' 日本化学会予稿集, 2001, vol. 79th, no. 2, p. 1042 4G304	1-17
Y	JP 7-252288 A (生化学工業株式会社) 1995.10.03 文献全体、p. 6-8 (ファミリーなし)	1-17
Y	FUKASE, K. et al. 'Functional fluorescence labeling of carbohydrates and its use for preparation of neoglycoconjugates: J. Carbohydrate Chemistry, 1994, vol. 13, no. 5, p. 715-736 文献全体、p. 723	1-17
Y	JP 2002-80488 A (大阪大学長) 2002.03.19 文献全体、 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-17
Y	WO 96/17613 A1 (NEORX CORP) 1996.06.13 文献全体、claims、 FIG. 2C & EP 794788 A1 & JP 2001-525790 A & US 5886143 A & US 5985826 A	1-17
Y	LINDHORST, T.K. et al. 'Glycocoating of oligovalent amines: synthesis of thiourea-bridged cluster glycosides from glycosyl isothiocyanates.' Angewandte Chemie, International Edition in English, 1996, vol. 35, no. 17, p. 1953-1956	1-17
Y	WELLS, N.J. et al. 'Solid-phase dendrimer synthesis.' Biopolymers, 1999, vol. 47, no. 5, p. 381-396	1-17

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/09973

<調査の対象について>

請求の範囲1の発明に係る、式(1)の化合物は、その端部Xの構造について「末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多岐部位である構造を備えている」旨の限定しかなされていない。そして、このようなXの構造は多岐にわたることから、請求の範囲1は非常に多数の化合物を包含するものである。

しかしながら、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎない。

よって調査は、明細書に具体的に裏付けられ、開示されている部分、即ち、請求の範囲2, 6, 7において式(2)、式(3)、式(4)として表される化合物について主に行った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.